

# **Die Hämoxygenase BphO aus** ***Pseudomonas aeruginosa***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Rosalina Wegele

aus Kant

1. Referent: Prof. Dr. N. Frankenberg-Dinkel

2. Referent: Prof. Dr. D. Jahn

eingereicht am: 24.04.2006

mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.06.06

Druckjahr: 2006

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch Prof. Dr. D. Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Wegele, R., Tasler, R., Zeng, Y., Rivera, M., A., & Frankenberg-Dinkel, N. (2004) „The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*” *J. Biol. Chem.*, **279**, 45791-45802

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Hämoxygenasen.....</b>	<b>10</b>
2.1.1	Pflanzliche Hämoxygenasen .....	11
2.1.2	Bakterielle Hämoxygenasen.....	12
<b>2.2</b>	<b>Reaktionsmechanismus der Hämoxygenasen.....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Strukturelle Ähnlichkeiten von HOs .....	18
2.2.2	Hämbindungstasche .....	19
2.2.3	Regiospezifität der Hämoxygenasen .....	19
<b>2.3</b>	<b>Das Hämoxygenase-Phytochrom-System aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>20</b>
2.3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
2.3.2	Die Hämoxygenasen BphO und PigA aus <i>P. aeruginosa</i> .....	21
2.3.3	Das Phytochrom BphP aus <i>P. aeruginosa</i> .....	22
<b>2.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Geräte und Chemikalien.....</b>	<b>25</b>
3.1.1	Geräte .....	25
3.1.2	Chemikalien, Enzyme und Kits.....	25
<b>3.2</b>	<b>Bakterienstämme und Plasmide .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Kulturmedien und Zusätze.....</b>	<b>27</b>
3.3.1	Medien.....	27
3.3.2	Zusätze .....	28
<b>3.4</b>	<b>Mikrobiologische Techniken .....</b>	<b>28</b>
3.4.1	Sterilisation.....	28
3.4.2	Wachstumsbedingungen.....	29
3.4.2.1	Aerobe Zellzucht .....	29
3.4.2.2	Anaerobe Zellzucht .....	29
3.4.2.3	Bestimmung von Zelldichte .....	29
3.4.2.4	Plattenkulturen von Bakterien .....	29
3.4.2.5	Lagerung von Bakterien .....	29
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>30</b>
3.5.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	30
3.5.2	Transformation von Bakterien .....	30
3.5.3	Plasmidpräparation.....	31
3.5.4	Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit.....	31
3.5.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	31
3.5.6	Ortsgerichtete Mutagenese ( <i>site-directed mutagenesis</i> ) .....	32
3.5.7	Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung .....	33

<b>3.6</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.6.1	Rekombinante Darstellung der Hämoxygenase BphO.....	34
3.6.1.1	Rekombinante Proteinsynthese .....	34
3.6.1.2	Zellkultivierung .....	34
3.6.1.3	Zellaufschluß .....	35
3.6.1.4	Erste Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose™ 4B .....	35
3.6.1.5	Protease-Verdau .....	35
3.6.1.6	Zweite Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose™ 4B .....	35
3.6.1.7	Dialyse.....	35
3.6.1.8	Konzentrierung.....	36
3.6.2	Anaerobe Proteinreinigung .....	36
<b>3.7</b>	<b>Proteincharakterisierung.....</b>	<b>36</b>
3.7.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	36
3.7.2	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
3.7.3	Analytische Gelpermeationschromatographie .....	38
3.7.4	Bestimmung der Aktivität von BphO.....	39
3.7.4.1	Hämtitration .....	39
3.7.4.2	Ermittlung des Extinktionskoeffizienten des BphO-Häm-Komplexes .....	39
3.7.5	BphO-Aktivitätstest.....	40
3.7.5.1	Prinzip des Enzymtests.....	40
3.7.5.2	Bildung und Reinigung des BphO-Häm-Komplexes.....	40
3.7.6	Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des BphO-Häm-Komplexes.....	40
3.7.6.1	Gekoppelter Enzymtest .....	40
3.7.6.2	Gekoppelte Oxidation des BphO-Häm-Komplexes.....	41
3.7.6.3	Umsetzung des BphO-Häm-Komplexes in Anwesenheit von Katalase .....	42
3.7.6.4	Umsetzung des BphO-Häm-Komplexes in Anwesenheit von Eisenchelatoren .....	42
3.7.7	Auswertung des gekoppelten Enzymtests mittels HPLC.....	42
3.7.7.1	Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse.....	42
3.7.7.2	Analyse der Reaktionsprodukte mittels HPLC .....	43
3.7.8	Biliverdinreduktase-Test .....	43
<b>3.8</b>	<b>NMR-Spektroskopie.....</b>	<b>43</b>
<b>3.9</b>	<b>Differenzspektroskopie .....</b>	<b>44</b>
<b>3.10</b>	<b>Untersuchungen zur Interaktion zwischen BphO und BphP .....</b>	<b>45</b>
3.10.1	Immunopräzipitation .....	45
3.10.1.1	<i>In vivo</i> -Immunopräzipitation.....	45
3.10.1.2	<i>In vitro</i> -Immunopräzipitation.....	46
3.10.1.3	Western-Blot .....	46
3.10.1.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	46
3.10.1.5	Visualisierung mit Farbreaktion.....	46
3.10.1.6	Visualisierung mit Chemilumineszenzreaktion .....	47
3.10.2	Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels Gelpermeationschromatographie .....	47
3.10.3	Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels SPR.....	47
3.10.3.1	Aminkopplung.....	48
3.10.3.2	Streptavidin-Biotin-Kopplung.....	49

3.10.3.3	Auswertung der gemessenen BphO-BphP-Interaktion mittels SPR .....	49
<b>3.11</b>	<b>Kristallisationsversuche mit BphO aus <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>3.12</b>	<b>Bioinformatische Methoden .....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
4.1.1	Rekombinante Produktion und Reinigung von BphO aus <i>P. aeruginosa</i> .....	52
4.1.2	Identifizierung der BphO-Reaktionsprodukte mittels Biliverdinreduktase-Test 54	
4.1.3	Identifizierung der BphO- und PigA-Reaktionsprodukte mittels HPLC .....	55
<b>4.2</b>	<b>Analytische Gelpermeationschromatographie .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3</b>	<b>Katalytische Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes.....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Hämbindungsstudien .....	57
4.3.2	Ermittlung des Extinktionskoeffizienten.....	58
4.3.3	Untersuchungen zu Redoxpartnern der <i>P. aeruginosa</i> BphO .....	58
4.3.4	Auswirkung von unterschiedlichen Elektronendonatoren auf den Verlauf der Hämoxygenase-Reaktion .....	61
4.3.5	Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes in Anwesenheit von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	65
<b>4.4</b>	<b>Mutagenesestudien zur Identifizierung des proximalen Eisen-Liganden bei BphO aus <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>68</b>
4.4.1	Die <i>P. aeruginosa</i> BphO-Variante H20A .....	70
4.4.2	Spektroskopische Charakterisierung des <i>P. aeruginosa</i> BphOs mittels NMR- Spektroskopie .....	74
4.4.3	Interaktion zwischen BphO und BphP .....	77
4.4.4	Interaktion zwischen BphO:BV-, PigA:BV-Komplexen und BphP .....	78
4.4.5	Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels Gelpermeationschromatographie .....	78
4.4.6	Mutagenesestudien zur Charakterisierung der Interaktion zwischen BphO und BphP	79
4.4.7	Immunopräzipitation .....	84
4.4.7.1	<i>In vitro</i> -Immunopräzipitation .....	84
4.4.7.2	<i>In vivo</i> -Immunopräzipitation.....	87
4.4.8	Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels SPR.....	88
<b>4.5</b>	<b>Kristallisation .....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>94</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolphosphat
bp	Basenpaare ( <i>base pairs</i> )
Bph	Bakteriophytochrom
BphO	Hämoxygenase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR	Bilirubin
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovin serum albumin</i> )
BV	Biliverdin
BVR	Biliverdinreduktase
bzw.	beziehungsweise
°C	grad Celsius
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
Da	Dalton
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (meist als Dinatriumsalz vorliegend)
EtOH	Ethanol
FNR	Ferredoxin:NADP <sup>+</sup> Oxidoreduktase
FPLC	Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie ( <i>fast protein liquid chromatography</i> )
Fur	Eisen-Aufnahme-Regulator ( <i>feric uptake regulator</i> )
GAF	Domäne, die zuerst beschrieben wurde in cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen aus Vertebraten, cyanobakteriellen Adenylatcyclasen und dem bakteriellen Formiathydrogenlyase-

	Transkriptionsaktivator FhlA
Glk-6-P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPC	Gelpermeationschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HKD	Histidinkinasedomäne
HO	Hämoxygenase
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HY2	Ferredoxin-abhängige Phytochromobilin-Synthase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani (Medium)
M	Molar
mg	milligramm
min	Minute(n)
Mr	relative molekulare Masse
$\mu$ M	$\mu$ Molar
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
ng	nanogramm
OD	Optische Dichte
orf	Offenes Leseraster, „ <i>open reading frame</i> “
<i>PaBphP</i>	Phytochrom aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEB	Phycoerythrobilin
PebA	15,16-Dihydrobiliverdin:Ferredoxin Oxidoreduktase
PebB	3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase
PEG	Polyethylenglycol
P $\Phi$ B	Phytochromobilin

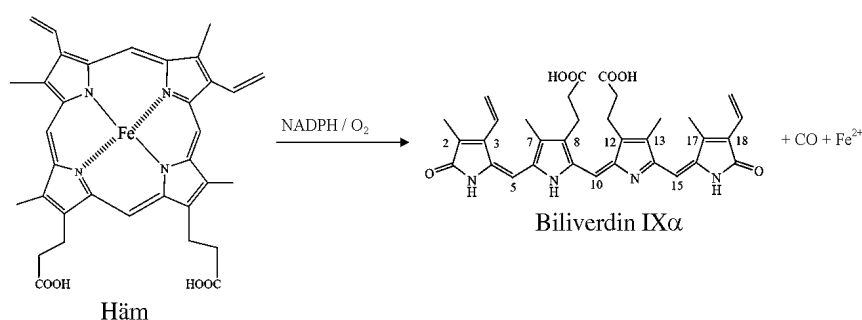


PHY	Phytochromdomäne
PigA	Hämoxygenase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RRD	Antwortregulatordomäne
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde(n)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluor-Essigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	Über Nacht
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

## 2 Einleitung

### 2.1 Hämoxygenasen

Hämoxygenasen (HOs) sind Enzyme, die eine oxidative Spaltungsreaktion von Häm zu Biliverdin (BV) und Eisen unter Entstehung von Kohlenmonoxid (CO) katalysieren (Abbildung 1).

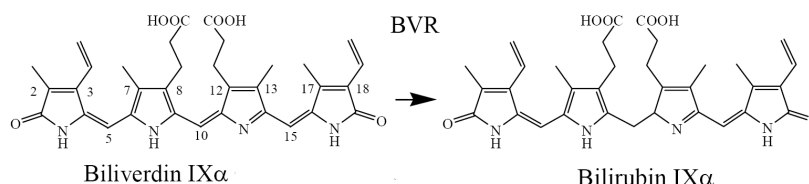


**Abbildung 1:** Abbau von Häm zu Biliverdin IX $\alpha$ .

Die hochkonservierte humane Hämoxygenase (HO-1) wurde erstmals 1968 beschrieben und zunächst der Cytochrom P450-Familie zugeordnet (Tenhunen *et al.*, 1968). Nach der ersten biochemischen Charakterisierung des Enzyms (Yoshida und Kikuchi, 1978) wurde die Hämoxygenase einer eigenen Familie zugeordnet, da sich die Hämoxygenase-Reaktion von der Reaktion anderer Häm-abhängiger Enzyme, wie den Cytochromen P450, den Peroxidasen und Katalasen unterscheidet. Es existieren zwei Gene, die für eine HO codieren, wobei die Form mit einer relativen molekularen Masse von 32.000 als hHO-1 bezeichnet wird. Die später entdeckte zweite Isoform wird als HO-2 bezeichnet und weist eine relative molekulare Masse von 34.000 auf (Maines *et al.*, 1977). Die Isoformen der HO sind Produkte zweier unterschiedlicher Gene. Dennoch weisen sie eine Aminosäuresequenzhomologie von 40% auf (Maines, 1988). Während HO-1 beim Hämkatabolismus und bei der Wiederverwertung von Eisen eine wichtige Rolle spielt, nimmt HO-2 an intrazellulären Signalmechanismen über CO, dem Nebenprodukt der HO-Reaktion, teil (Snyder *et al.*, 1998). CO erfüllt mehrere biologische Funktionen. Seine wichtigste Fähigkeit besteht in der Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (Kharitonov *et al.*, 1995). Diese Eigenschaft teilt CO mit einer Gruppe kleiner Moleküle, zu denen auch Stickstoffmonoxid gehört (Schmidt, 1992).

Der erste Schritt im Hämkatabolismus der Säugetiere ist die Umsetzung des Hämmoleküls

zu BV. Anschließend wird das BV von der NADPH-abhängigen Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin (BR), dem Endprodukt des Hämabbaus bei Säugern, reduziert. Die Reaktionsrate bei dieser Umsetzung wird durch BVR limitiert (Liu und Ortiz de Montellano, 2000) (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Umsetzung von Biliverdin (BV IX $\alpha$ ) zu Bilirubin (BR IX $\alpha$ ) durch das Enzym Biliverdinreduktase (BVR).

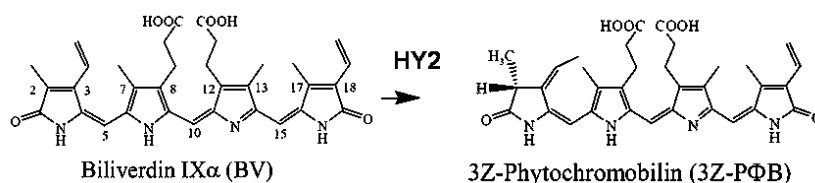
Später wurden HOs in Pflanzen (Koornneef *et al.*, 1980), Rotalgen (Beale und Cornejo, 1984) und Cyanobakterien (Cornejo und Beale, 1997), aber auch in einigen pathogenen und nicht-photosynthetischen Bakterien entdeckt und beschrieben (Wilks und Schmitt, 1998; Zhu *et al.*, 2000; Ratliff *et al.*, 2001). Neben der primären Aufgabe, Eisen aus alternden roten Blutkörperchen zu rezyklieren, sind HOs an vielen essenziellen physiologischen Prozessen, wie z.B. am Schutz gegen oxidativen Stress, beteiligt. In Säugern übernimmt die HO die Eisenversorgung und nimmt an intrazellulären Signalmechanismen teil. In Cyanobakterien, Rotalgen und höheren Pflanzen übernehmen HOs die Synthese von wichtigen licht-sammelnden Pigmenten und in pathogenen Bakterien die Eisengewinnung. Obwohl HOs an unterschiedlichen physiologischen Stoffwechselwegen teilnehmen, sind allen diesen Prozessen die Struktur und der Ablauf des katalytischen Mechanismus gemeinsam. Alle bisher charakterisierten HOs aus Säugern und Pflanzen spalten Häm regiospezifisch an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke und bilden somit BV IX $\alpha$ .

### 2.1.1 Pflanzliche Hämoxygenasen

Mittlerweile sind eine ganze Reihe von Pflanzen wie z.B. Reis, Mais, Gerste, Baumwolle und Tomaten bekannt, die multiple Gene der HO-Familie besitzen (Davis *et al.*, 2001). Pflanzliche HOs sind lösliche Proteine, die in den Plastiden lokalisiert sind. Für die enzymatische Aktivität benötigen HOs aus Pflanzen molekularen Sauerstoff und Elektronen. Durch *in vitro* Experimente konnte reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator nachgewiesen werden (Willows *et al.*, 2000; Muramoto *et al.*, 2002). Die am besten

charakterisierte Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* enthält vier HO kodierende Gene, *hyl*, *ho2*, *ho3* und *ho4* (Emborg *et al.*, 2006). Während rekombinante Ferredoxin-abhängige HY1, in der Lage ist, Häm zu BV IX $\alpha$  umzusetzen (Davis *et al.*, 1999; Muramoto *et al.*, 2002), steht die biochemische Charakterisierung von HO2, HO3 und HO4 noch bevor. HY1, HO3 und HO4 sind in die Biosynthese von Phytochrom-Chromophoren involviert, was durch Untersuchungen mit defizienten Mutanten nachgewiesen werden konnte (Emborg *et al.*, 2006).

HOs aus Pflanzen spielen eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Phytobilinen. Phytobiline sind lineare Tetrapyrrole und werden von Pflanzen, Cyanobakterien und Rotalgen als Chromophore für Phytochrome verwendet. Phytochromobilin (PΦB), ein direkter Vorläufer des pflanzlichen Phytochrom-Chromophores, wird ausgehend von BV IXα synthetisiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Syntheseweg für die Phytobilin PΦB ausgehend von BV IXα. HY2, 3Z-Phytochromobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase.

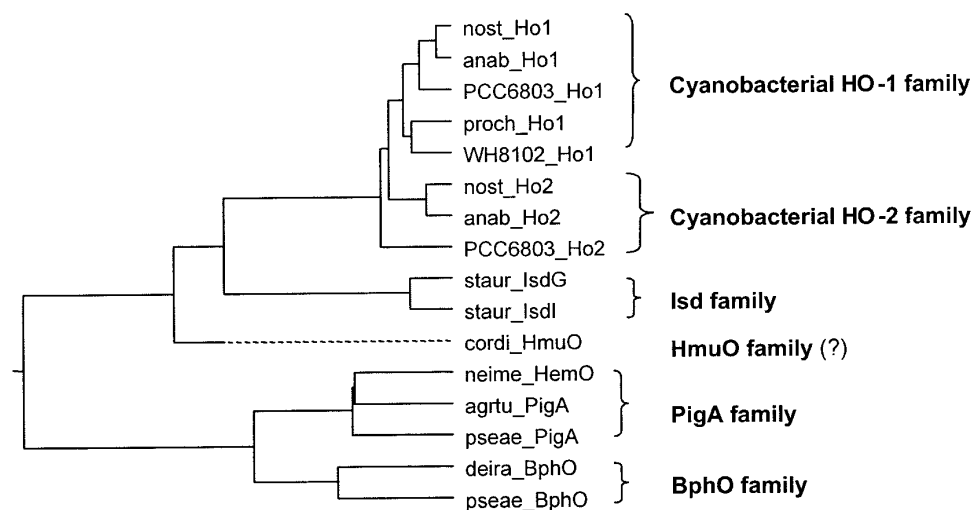
BV IX $\alpha$  wird anschließend von einer Ferredoxin-abhängigen Phytochromobilin-Synthase (HY2) zu 3Z-P $\Phi$ B umgesetzt (Terry *et al.*, 1995; Frankenberg *et al.*, 2001; Kohchi *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Bakterielle Hämoxygenasen

Die Erkenntnis, dass bakterielle HOs an der Pathogenität, der Eisengewinnung und der Biosynthese von Chromophoren beteiligt sind, hat zu einem breitgefächertem Interesse an deren Erforschung geführt. Bakterielle HOs katalysieren die Umsetzung von Häm zu BV IX $\alpha$ , Eisen und CO. Diese Reaktion benötigt, wie die Hämoxygenase-Reaktion in Säugtieren molekularen Sauerstoff. Für *in vitro* Untersuchungen der enzymatischen Aktivität der bakteriellen HOs wurden sowohl die humane Cytochrom P450 Reduktase (CPR) als auch Ascorbinsäure verwendet. Im Wesentlichen unterscheiden sich bakterielle und eukaryotische HOs in ihrer Löslichkeit und Größe. Bakterielle HOs sind lösliche, zytoplasmatische, nicht membrangebundene Proteine. Die relative molekulare Masse von bakteriellen HOs ist mit 25.000 etwas kleiner, als die von eukaryotischen HOs mit ca. 33.000 (Maines

et al., 1997; Yoshida und Kikuchi, 1978,).

Sequenzanalysen bakterieller HOs geben einen Einblick in die enge phylogenetische Verwandtschaft, die in Abbildung 4 dargestellt ist (Frankenberg-Dinkel, 2004). Innerhalb der bakteriellen HOs lassen sich sechs Familien unterscheiden: cyanobakterielle SyHO-1 und SyHO-2, Isd, HmuO, PigA und BphO. Diese Familien werden im Folgenden genauer beschrieben.



**Abbildung 4:** Phylogenetischer Baum der bakteriellen HOs. Nost. *Nostoc punctiforme*; anab. *Anabena* sp. PCC7120; PCC6830, *Synechosystis* sp. PCC6830; WH8120, *Synechococcus* sp. WH8102; staur, *Staphylococcus aureus*; cordi, *Corynebacterium diphtheriae*; neime, *Neisseria meningitidis*; agrtu, *Agrobacterium tumefaciens*, pseae, *Pseudomonas aeruginosa*; deira, *Deinococcus radiodurans*.

Die erste beschriebene bakterielle Hämoxygenase, HmuO, wurde in dem Gram-positiven pathogenen Bakterium *Corynebacterium diphtheriae* entdeckt und der Familie HmuO zugeordnet. Basierend auf einer Aminosäuresequenzhomologie von 33% zur eukaryotischen HO-1 wurde HmuO biochemisch charakterisiert (Schmitt, 1997). *In vivo* Studien zeigen, dass HmuO in der Lage ist, Häm unter eisenlimitierenden Bedingungen oxidativ zu BV IX $\alpha$ , CO und Eisen zu spalten und somit Häm als alleinige Eisen-Quelle zu nutzen (Wilks und Schmitt, 1998).

Hämoxygenasen aus Cyanobakterien gehören zu den HO-1- und HO-2-Familien und sind bisher am besten charakterisiert. Das Genom von *Synechosystis* sp. kodiert für zwei potenzielle HOs, SyHO-1 und SyHO-2, die eine Aminosäuresequenzhomologie von 51% zu einander aufweisen (Cornejo *et al.*, 1998). Die erste charakterisierte HO aus Cyanobakterien ist SyHO-1 aus *Synechosystis* sp. PCC6803 (Cornejo *et al.*, 1998). Reinigungsverfahren brachten später den Nachweis der zweiten Isoform, SyHO-2, (Zhang *et al.*, 2005). Beide Proteine, SyHO-1 und SyHO-2, zeigen *in vitro* eine Hämoxygenase-Aktivität.

Die für HO-1 und HO-2 kodierenden Gene wurden auch in sequenzierten Cyanobakterien wie *Anabaena* sp. PCC7120, *Thermosynechococcus elongatus* und *Nostoc punctiforme* gefunden.

Cyanobakterielle HOs können unter *in vitro*-Bedingungen, wie die pflanzlichen HOs auch, reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator nutzen. Interessanterweise verläuft die Katalyse in Anwesenheit eines zweiten Reduktionsmittels, wie Ascorbinsäure oder Trolox, bei cyanobakteriellen HOs effizienter (Cornejo *et al.*, 1998).

Zwei weitere HOs, IsdG und IsdI, wurden in dem Gram-positiven pathogenen Bakterium *Staphylococcus aureus* identifiziert und biochemisch charakterisiert (Skaar *et al.*, 2004). Das *isdG*-Gen und das *isdI*-Gen befinden sich in einem *isd*-Operon (*iron-regulated surface determinants*), das unter der Kontrolle des globalen Eisenregulators Fur (*ferric uptake regulator*) steht (Mazmanian *et al.*, 2003). IsdG und IsdI sind ungewöhnlich kleine Proteine mit einer relativen molekularen Masse von ca. 13 000. Sie weisen wenig Homologien zu den anderen bekannten bakteriellen HOs auf. Nur in solchen Gram-positiven pathogenen Bakterien wie *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes* und *Bacillus anthracis* findet man Sequenzen mit Homologien zu IsdG und IsdI. Wie bei den meisten pathogenen Bakterien sind auch die IsdG und IsdI aus *S. aureus* in die Eisenaufnahme involviert.

HemO aus dem obligat pathogenen, Gram-negativen Bakterium *Neisseria meningitidis* ist eine klassische HO und bildet BV IX $\alpha$ . HemO spielt eine essenzielle Rolle bei der Eisengewinnung aus Häm und Hämoglobin. Dies konnte durch Untersuchungen mit chromosomalen HemO-defizienten Mutanten aufgeklärt werden (Zhu *et al.*, 2000).

Zu der PigA-Familie gehören z.B. das *pigA*-Gen aus dem Gram-negativen opportunistisch pathogenen Bakterium *P. aeruginosa* (Ratliff *et al.*, 2001). Das *pigA*-Gen wurde ursprünglich bei der Suche nach eisenregulierenden Genen gefunden. Dabei konnte gezeigt werden, dass PigA eine Aminosäuresequenzhomologie von 37% zu HemO aus *N. meningitidis* aufweist (Ratliff *et al.*, 2001). PigA ist die erste HO, die eine andere Regiospezifität für Häm aufweist und die ungewöhnlichen Biliverdine, BV IX $\beta$  und BV IX $\delta$ , bildet. Die Rolle der von PigA produzierten BV-Isomere ist bis heute noch unklar.

Die BphO-Familie wurde erstmal in den nicht-photosynthetischen Bakterien wie *P. aeruginosa* und *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert (Bhoo *et al.*, 2001). Das für die Hämoxygenase kodierende Gen, *bphO* (*bacterial phytochrome heme oxygenase*), ist in der Regel zusammen mit einem für bakterielle Phytochrome kodierenden Gen, *bphP* (*bacterial phytochrome*), stromaufwärts in einem Operon organisiert.

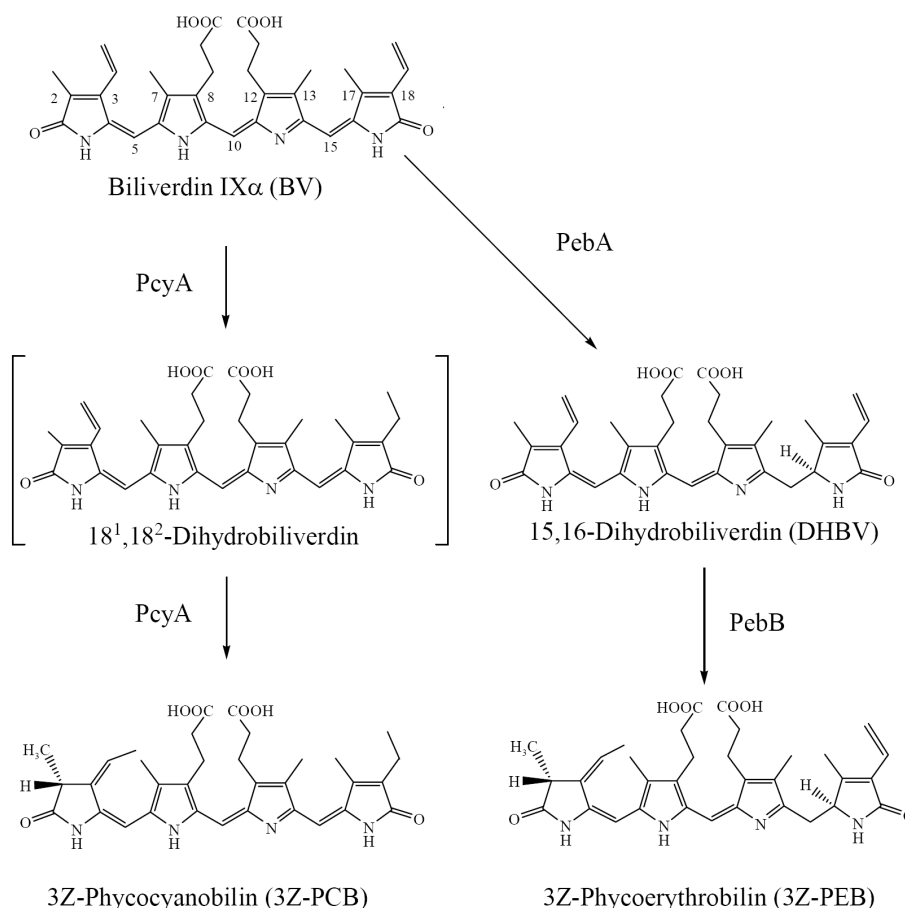
Wie bereits beschrieben, spielen HOs bei der Eisenversorgung der Bakterien eine wichtige Rolle. Eisen ist ein limitierender Faktor für bakterielles Wachstum und kann die Ansiedlung von pathogenen Bakterien beeinflussen. Viele Bakterien produzieren spezifische eisenbindende Proteine, so genannte Siderophore, die Eisensalze lösen und in die Zelle transportieren. Siderophore bestehen aus einer Fettsäurekette mit einem Kopf aus Peptiden. Dieser Peptidkopf bildet einen Komplex mit dreiwertigen Eisen-Ionen. Die Siderophore werden von den Bakterien wieder aufgenommen, um innerhalb der Bakterien werden diese wieder abgebaut und das Eisen-Ion wird freigelassen.

Da das meiste körpereigene Eisen intrazellulär im Häm gebunden ist, haben viele pathogene Bakterien Systeme entwickelt, die es erlauben, Häm als Eisenquelle zu nutzen. Es gibt zwei Mechanismen in prokaryotischen Organismen, Eisen aus Häm, Hämoglobin, Haptoglobin oder Hämoexin zu gewinnen. Der erste Mechanismus ist die oxidative Spaltung des Häms mittels Hämoxygenasen (Schmitt, 1997). Dadurch gewinnen Bakterien wie *Neisseria spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mitis*, *Listeria monocytogenes* und *S. epidermitis* Eisen aus Häm. Der zweite Mechanismus ist die Entfernung des Eisenatoms aus Häm durch eine Rückwärtsreaktion der Ferrochelatase (Loeb, 1995). Ferrochelatase katalysiert Eiseninsertion, dadurch wird Protohäm IX gebildet, von dem sich alle anderen Häme ableiten.

In Gram-negativen Bakterien wird Häm oder hämhaltige Proteine zuerst an Rezeptoren der äußeren Membran gebunden. Anschließend erfolgt der Transport des Häms über die äußere Membran durch TonB-ExbB-ExbD-basierende Transportsysteme. Viele Bakterien bilden außerdem Hämoexin, die extrazelluläres Häm und Hämoglobin binden und zur äußeren Membran transportieren (Clarke *et al.*, 2001). Der Transport über die zytoplasmatische Membran erfordert ABC-Transporter (Andrews *et al.*, 2003). Viele der Eisenaufnahmesysteme werden von globalen Eisen-Regulatoren, wie z.B. Fur, kontrolliert. Fur ist ein klassischer apo-Repressor, der an die DNA-Sequenzen (Fur-Boxen) in den Promotorregionen von eisen-regulierenden Genen bindet. Wenn die intrazelluläre Konzentration an  $\text{Fe}^{2+}$  eine bestimmte Konzentration unterschreitet, wird die Expression des Fur-Repressors unterdrückt.

Häm-Aufnahmesysteme wurden auch für Gram-positive Bakterien, wie *Corynebacterium* und *Streptococcus*, beschrieben (Drazek *et al.*, 2000; Schmitt, 1997; Tai *et al.*, 1997). *C. diphtheriae* enthält drei Gene, *hmuT*, *hmuU* und *hmuV*, deren Produkte das Häm-Aufnahmesystem bilden. Häm wird zuerst an ein membranassoziiertes Protein HmuT gebunden und anschließend über die Permease HmuU in das Zytoplasma transportiert,

wobei die dafür nötige Energie von der ATPase HmuV geliefert wird (Drazek *et al.*, 2000). In Cyanobakterien nehmen HOs an der Biosynthese der Phycobiline teil, die in großen Mengen als Pigmente für die Photosynthese gebildet werden. Sie sind an Phycobiliproteinen in den als Phycobilisomen bezeichneten Lichtsammelkomplexen gebunden. Außerdem verwenden cyanobakterielle Phytochrome Phycobiline als Chromophor, der die Wahrnehmung von Licht ermöglicht. Die Hämoxygenase-Reaktion stellt den ersten Schritt in der Biosynthese der Phycobiline dar. BV IX $\alpha$  wird von Ferredoxin-abhängigen Bilin-reduktasen mit unterschiedlicher Doppelbindungsspezifität weiter zu Phycocyanobilin (PCB) und Phycoerythrobilin (PEB) umgesetzt (Frankenberg *et al.*, 2001). Die Biosynthese der Phycobiline ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.



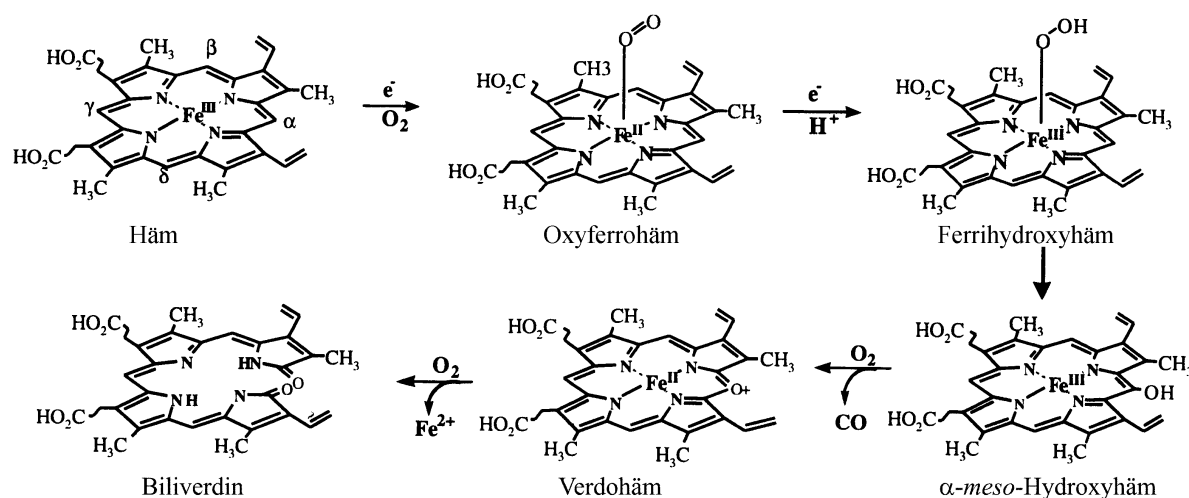
**Abbildung 5:** Syntheseweg für die Phycobiline PCB und PEB ausgehend von BV. PcyA, 3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase; PebA, 15,16-Dihydrobiliverdin:Ferredoxin Oxidoreduktase; PebB, 3Z-Phycoerythrobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase.

## 2.2 Reaktionsmechanismus der Hämoxygenasen

Die Abbaureaktion von Häm ist im Gegensatz zu der Synthese seit vier Jahrzehnten



bekannt (Tenhunen *et al.*, 1968). Aus dem strukturell ähnlichen Grundgerüst aller Häm-oxygenasen lässt sich ein gemeinsamer Mechanismus des Hämabbaus ableiten (Abbildung 6).

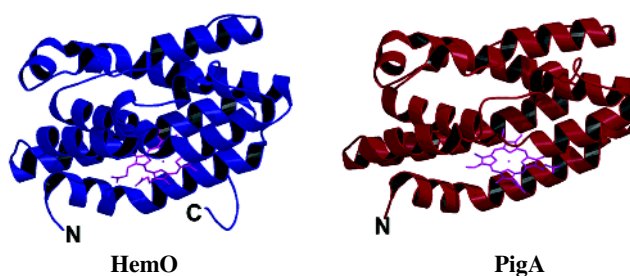


**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Oxidation des Häms zu Biliverdin.

Es wird postuliert, dass die Reaktion über mehrere Zwischenschritte erfolgt. Die Reaktion startet mit der Bildung eines Häm-Hämooxygenase-Komplexes  $[(\text{Fe}^{3+})\text{Häm}:\text{HO}]$ . Anschließend folgt die erste Elektronenübertragung, wobei  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird und ein Ferro-Komplex  $[(\text{Fe}^{2+})\text{Häm}:\text{HO}]$  entsteht. Im nächsten Schritt bindet der Ferro-Komplex molekularen Sauerstoff an Eisen zu einem metastabilen Oxyferro-Komplex  $[\text{O}_2-(\text{Fe}^{2+})\text{Häm}:\text{HO}]$ . Bei der nächsten Elektronenübertragung wird der Ferrihydroperoxy-Komplex gebildet  $[\text{HO}-\text{O}-(\text{Fe}^{3+})\text{Häm}:\text{HO}]$  (Yoshida *et al.*, 1980). Nach anschließender Hydroxylierung an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke entsteht das  $\alpha$ -meso-Hydroxyhäm (Wilks und Ortiz de Montellano, 1993). Der nächste Schritt in der enzymatischen Umsetzung des Häms ist die Umwandlung des  $\alpha$ -meso-Hydroxyhäms zu Ferro-Verdohäm. Dabei wird  $\text{CO}$  freigesetzt. Anschließend, in Anwesenheit vom molekularen Sauerstoff und Elektronen, entsteht Eisen-Biliverdin  $[(\text{Fe}^{3+})\text{-BV}]$ . Für die Freisetzung des BVs muss  $\text{Fe}^{3+}$  aus dem Eisen-Biliverdin-Komplex zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert werden (Yoshida *et al.*, 1980). Die Freisetzung des BVs ist der bisher am wenigsten charakterisierte Schritt dieser Reaktion. Wie beschrieben, unterscheidet sich die Hämooxygenase-Reaktion von der Reaktion anderer Hämproteine. Die Reaktionen verlaufen bis zum Oxyferro-Komplex  $[\text{O}_2-(\text{Fe}^{2+})\text{Häm}:\text{HO}]$  identisch. Danach spalten Hämproteine die  $[\text{O}-\text{O}]$ -Bindung im Oxyferro-Komplex heterolytisch, wobei ein Ferryl-Intermediat  $[(\text{Fe}-\text{O})^{4+}]$  entsteht (Lee-Robichaud *et al.*, 1995; Sono *et al.*, 1996).

### 2.2.1 Strukturelle Ähnlichkeiten von HOs

Die meisten strukturellen Daten der HOs stammen von gelösten Kristallstrukturen der humanen HO-1 und der HO aus der Ratte. Mittlerweile sind auch Kristallstrukturen der HOs aus Bakterien wie *C. diphtheriae* (HmuO) (Hirotsu *et al.*, 2004), *N. meningitidis* (HemO) (Schuller *et al.*, 2001) und *P. aeruginosa* (PigA) (Friedman *et al.*, 2004) bekannt. Trotz der geringen Sequenzhomologien von HemO (22%), HmuO (33%) und PigA (19%) zur humanen HO-1 besitzen alle kristallisierten bakteriellen HO-Proteine die charakteristische  $\alpha$ -helikale Konformation der HO-1 aus Säugetieren, die aus acht rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices besteht. Interessanterweise haben bakterielle HOs kompaktere Strukturen und die distale Helix befindet sich näher am Hämmolekül als bei eukaryotischen HOs (Abbildung 7). Es ist bis heute noch nicht geklärt, ob diese strukturellen Unterschiede für die katalytischen Eigenschaften wichtig sind.



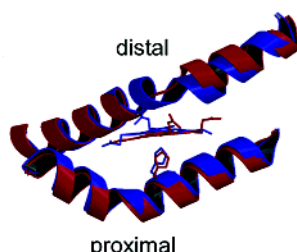
**Abbildung 7:** Kristallstruktur der HemO aus *N. meningitidis* (links) und der PigA aus *P. aeruginosa* (rechts) mit einem gebundenen Hämmolekül. Die Struktur zeigt eine typische  $\alpha$ -helikale Konformation.

Das Hämmolekül liegt in der Bindungstasche in einem "Sandwich" zwischen distaler und proximaler  $\alpha$ -Helix. Das sechsfachkoordinierte Eisen des Häms wird hierbei über einen neutralen Histidinliganden und durch ein Wassermolekül koordiniert (Sun *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994). Die distale Helix hat einen Knick von  $50^\circ$  direkt über der Hämoberfläche. Diese Beugung verleiht der HO Flexibilität in der Bindung des Häms und der Produktion des BVs (Wilks, 2002; Colas und Ortiz de Montellano, 2003). Anhand der Beugung der distalen Helix und Positionierung des Häms werden drei Typen der Konformation der HOs unterschieden. Die "offene" Konformation wurde für humane HO-1 (Schuller *et al.*, 1999), die "geschlossene" für HemO aus *N. meningitidis*, HmuO aus *C. diphtheriae* (Hirotsu *et al.*, 2004) und PigA aus *P. aeruginosa* (Friedman *et al.*, 2004), die "mehr geschlossene" für HO-1 aus Ratte (Sugishima *et al.*, 2000) beschrieben. Die "offene" und die "geschlossene" Konformation sind aufgrund der stabilisierenden Wasserstoffbrücken zwischen einem Glycin der distalen Helix und dem Eisen aus Häm stabiler

als die "mehr geschlossene" Konformation. Die Anwesenheit zweier benachbarter Propionseitenketten des Häms ist essenziell für die Substratspezifität des Enzyms.

### 2.2.2 Hämbindungstasche

Wie beschrieben, befindet sich das Hämmolekül in einem Sandwich-Komplex zwischen proximaler und distaler Helix der HOs (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Struktur der proximalen und distalen Helix der HemO aus *N. meningitidis* (blau) und PigA aus *P. aeruginosa* (rot).

Das proximale Histidin besetzt die fünfte Koordinationsstelle des Eisens und koordiniert somit das Hämmolekül innerhalb der Bindetasche (Schuller *et al.*, 2001). Mit Hilfe von Resonanz-Raman-, EPR- und NMR-Spektroskopie wurde das neutrale Histidin His20 in HmuO aus *C. diphtheriae* (Chu *et al.*, 1999) und His25 (Wilks *et al.*, 1995) aus humaner HO-1 als proximaler Ligand identifiziert. Die Rolle des proximalen Histidinliganden für die Häm-Koordination wurde mittels Mutagenesestudien (Wilks *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1999) untersucht. Diese Studien bestätigen, dass das proximale Histidin eine entscheidende Rolle bei der Hämoxygenase-Reaktion spielt (Wilks, 2002).

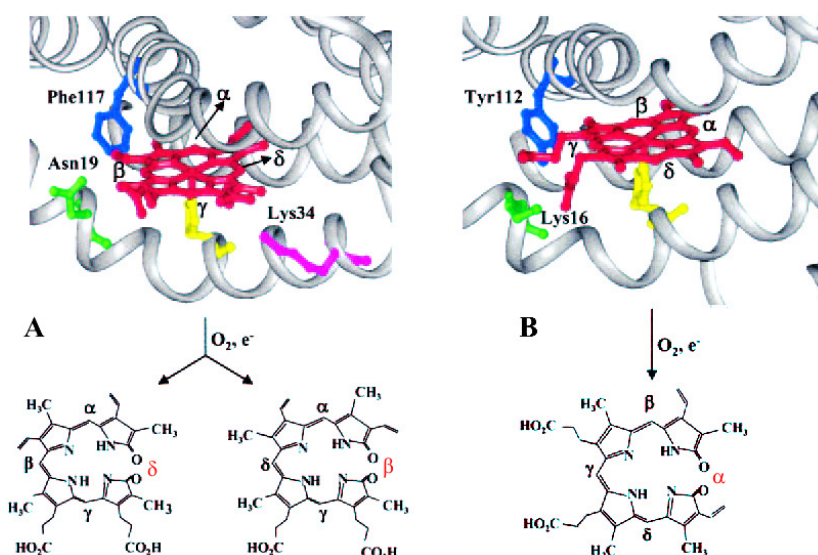
Die distale Helix ist kleiner als die proximale Helix und spielt bei der Substratbindung und der Freisetzung des Produktes eine wichtige Rolle (Wilks, 2002). Alle bekannten Kristallstrukturen von HOs beinhalten ein ähnliches Netz aus Wasserstoffbrücken um die distale Helix. Über diese Bindungen werden alle Protonen-Übertragungen und die zusätzliche Stabilisierung der Zwischenprodukten während der Reaktion gewährleistet.

### 2.2.3 Regiospezifität der Hämoxygenasen

Da die Spaltung des Häms zu vier unterschiedlichen Biliverdinisomeren führen kann, weisen HOs Regiospezifität auf (Bonnet, 1973). Die Namen der gebildeten Isomere deuten auf die Position der gespaltenen Kohlenstoffbrücke im Häm hin: BV IX $\alpha$ , BV IX $\beta$ , BV IX $\delta$  und BV IX $\gamma$ . Fast alle bisher charakterisierten HOs spalten Häm regiospezifisch an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke und bilden somit BV IX $\alpha$ . Eine Ausnahme stellt PigA aus *P. aeruginosa* dar, die die ungewöhnlichen Biliverdine BV IX $\beta$  und BV IX $\delta$  produziert.

Die Regiospezifität der enzymatischen Reaktion der BV IX $\alpha$  produzierenden HOs wurde

anhand der Kristallstrukturen ermittelt. Die Propionseitenketten des Häms treten in sterische Interaktion mit der distalen Helix der HOs und stabilisieren somit den Häm-HO-Komplex. Dies ist entscheidend für die Orientierung des Häms und seine anschließende Hydroxylierung. 2002 konnten Caignan *et al.*, einen Unterschied in der Orientierung des Hämmoleküls in einem PigA:Häm-Komplex mittels NMR-Spektroskopie nachweisen. Das Hämmolekül ist in dem PigA:Häm-Komplex um  $110^\circ$  um die  $\alpha$ - $\gamma$ -meso-Achse gedreht. Dadurch rückt die  $\delta$ -meso-Kohlenstoffbrücke des Hämmoleküls an die Position, an der sich bei den anderen HOs die  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke befindet. Deswegen sind die Produkte der Hydroxilierung des Häms durch PigA *in vitro* das BV IX $\beta$  (30%) und das BV IX $\delta$  (70%). Dies wurde anhand der später gelösten Kristallstruktur von PigA bestätigt (Friedman *et al.*, 2004) (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Koordination des Häms innerhalb der PigA aus *P. aeruginosa* (A) und der HemO aus *N. meningitidis* (B). **A:** Basierend auf der Drehung des Hämmoleküls um  $110^\circ$  um die  $\alpha$ - $\gamma$ -meso-Achse ergibt die Hydroxylierung des Häms bei *P. aeruginosa* das BV IX $\beta$  (30%) und das BV IX $\delta$  (70%). **B:** Die Hydroxylierung des Häms am  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke am Beispiel der HemO aus *N. meningitidis* mit Bildung BV IX $\alpha$ .

## 2.3 Das Hämoxygenase-Phytochrom-System aus *Pseudomonas*

### *aeruginosa*

#### 2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

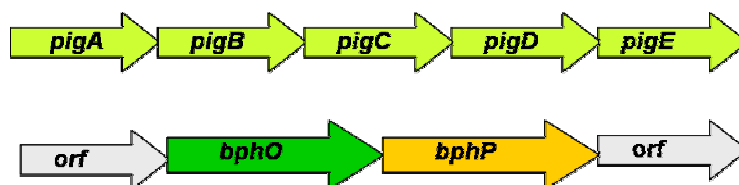
*P. aeruginosa* ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges und polar begeißeltes Bakterium. Es ist ein chemoorganotropher Organismus, dessen Wachstumsoptimum bei neutralem pH-Wert und mesophiler Temperatur liegt. Das Bakterium ist in unterschiedlichen

Habitaten wie Wasser, Boden oder Pflanzenteilen angesiedelt. Als opportunistisch pathogenes Bakterium kann *P. aeruginosa* jedoch auch Menschen und Tiere infizieren. Hierbei sind insbesondere immungeschwächte Personen gefährdet, bei denen das Bakterium Harnwege, größere Wunden oder die Lungen besiedeln kann. Eine bedeutende Rolle als pathogener Organismus spielt *P. aeruginosa* bei Menschen, die an zystischer Fibrose leiden. Hier kann es durch Besiedelung der Atemwege zu einer chronischen Infektion kommen.

### 2.3.2 Die Hämoxygenasen BphO und PigA aus *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* ist das erste beschriebene Bakterium, das zwei für unterschiedliche Hämoxygenasen kodierende Gene, *pigA* und *bphO*, besitzt.

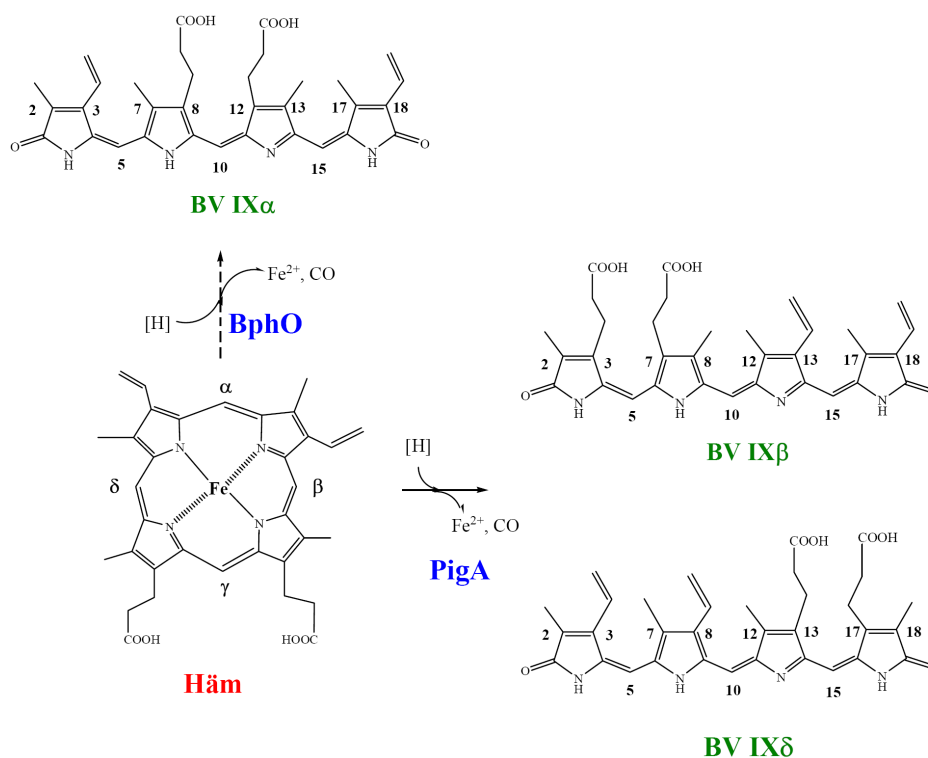
Das *pigA*-Gen ist Teil eines polycistronischen Operons, das aus fünf Genen besteht (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Organisation des *pigA*- und *bphO*-Operons in *P. aeruginosa*. *pigA* und *bphO*, Hämoxygenasegene; *bphP*, Phytochromgen; *orf*, unbekanntes offenes Leseraster.

Einige dieser Gene kodieren für Proteine, die in die Eisengewinnung involviert sind. Das *pigE*-Gen kodiert für einen alternativen  $\sigma$ -Faktor und einen Ferripyoverdinrezeptor, während das *pigD*-Gen für einen Siderophorrezeptor kodiert. Das Operon steht unter der Kontrolle des globalen Eisenregulators Fur und wurde unter eisenlimitierenden Bedingungen identifiziert (Vasil und Ochsner, 1999).

Wie bereits beschrieben, weist PigA eine Regiospezifität für die  $\beta$ - und  $\delta$ -meso-Kohlenstoffbrücke des Häms auf. Dabei entstehen die ungewöhnlichen BV IX $\beta$  und BV IX $\delta$  im Verhältnis 30:70 (Abbildung 11).



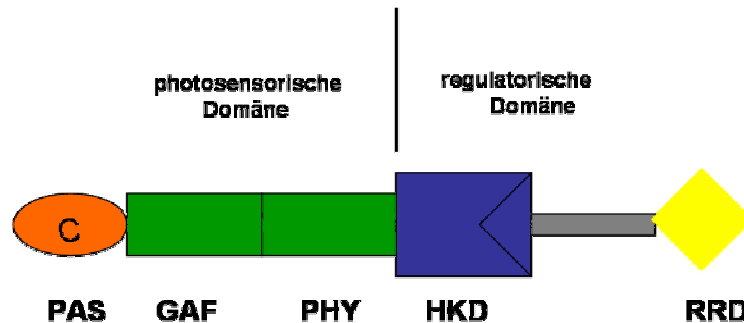
**Abbildung 11:** Hämoxygenasereaktionen in *P. aeruginosa*. Die Hämoxygenase BphO spaltet Häm an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke unter Bildung von BV IX $\alpha$ , während PigA Häm an der  $\beta$ - und  $\delta$ -meso-Kohlenstoffbrücke unter Bildung von BV IX $\beta$  und BV IX $\delta$  spaltet.

Auf der anderen Seite besitzt *P. aeruginosa* ein weiteres Gen, *bphO*, das für eine zweite Hämoxygenase kodiert. Das *bphO*-Gen befindet sich stromaufwärts zusammen mit dem *bphP*-Gen in einem Operon (Bhoo *et al.*, 2001). Die Organisation des *bphO*-*bphP*-Operons von *P. aeruginosa* ist in Abbildung 10 zusammengefasst. In diesem Operon befinden sich zwei weitere Gene, die für Proteine mit bisher unbekannter Funktion kodieren. Es wird vermutet, dass die beiden HOs aus *P. aeruginosa* unterschiedliche Hämquelle nutzen. Während PigA unter Eisenmangel wahrscheinlich extrazelluläres Häm des Wirtes für die Eisengewinnung nutzt, könnte intrazelluläres Häm in *P. aeruginosa* von BphO für die Produktion von BV benutzt werden.

### 2.3.3 Das Phytochrom BphP aus *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* ist ein nicht-photosynthetisches Bakterium, das ein typisches Bakteriophytochrom (Bphs) besitzt. Phytochrome wurden zuerst in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien entdeckt. Es sind Photorezeptoren, die Wellenlängen zwischen 650 und 750 nm im Rotlichtbereich des sichtbaren Spektrums mit Hilfe einer kovalent gebundenen prosthetischen Gruppe, einem linearen Tetrapyrrol absorbieren. Die Domänenstruktur des

Phytochroms aus *P. aeruginosa* (*PaBphP*) entspricht dem Aufbau bakterieller Phytochrome mit einem konservierten Cysteinrest in der N-terminalen PAS-Domäne und einer C-terminalen Histidin-Kinase-Domäne (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Domänenstruktur bakterieller Phytochrome. PAS, PAS-Domäne; GAF, GAF-Domäne; PHY, Phytochromdomäne; HKD, Histidinkinasedomäne; RRD, Antwortregulator-domäne.

Auf molekularer Ebene zeigen *PaBphPs* eine typische Aktivität für Sensorkinasen der Zwei-Komponenten-Systeme. Eine wichtige Eigenschaft, die BphPs von cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochromen unterscheidet, ist die Art des verwendeten Chromophors und die Position der Chromophorbindestelle. Assemblierungsstudien haben ergeben, dass BphPs BV IX $\alpha$  als Chromophor verwenden (Bhoo *et al.*, 2001; Lamparter *et al.*, 2004). Den meisten Bakterien fehlen Ferredoxin-abhängige Bilinreduktasen die in Pflanzen und Cyanobakterien BV IX $\alpha$  zum Phytochrom-Chromophor umwandeln. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass BV IX $\alpha$  der natürliche Chromophor der BphPs ist. Der Chromophor wird an einem konservierten Cysteinrest in der N-terminalen PAS-Domäne gebunden (Lamparter *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2005). Da *bphP* und *bphO* in einem Operon lokalisiert sind (Bhoo *et al.*, 2001), wird postuliert, dass das *bphO*-Genprodukt für die Biosynthese des funktionalen Phytochroms essenziell ist.

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Während die HO PigA aus *P. aeruginosa* gut charakterisiert ist, existieren wenig Informationen über die potentielle zweite HO, die BphO. Hierfür sollte im Rahmen dieser Arbeit BphO aus *P. aeruginosa* in *E. coli* produziert und die Reinigung etabliert werden. Ein weiteres Ziel bestand in der biochemischen Charakterisierung des gereinigten Enzyms, sowie die Etablierung eines Aktivitätstests. Neben der Identifizierung des Produktes der BphO-Reaktion sollte auch der natürliche Chromophor für BphP identifiziert werden. Da die *bphO*- und *bphP*-Gene in einem Operon vorliegen, sollte auch eine mögliche Interaktion zwischen BphO und BphP untersucht werden. Hierzu dienten Co-Immunopräzipitation und Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR). Weiterhin sollte BphO kristallisiert werden, um anschließend eine Röntgenstruktur ableiten zu können.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte und Chemikalien

##### 3.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte. Angegeben sind Model und Herstellerfirma.

Geräte	Model	Quelle
Agarose-Gelelektrophorese	ComPhor L Mini	Biozym
Anaerobes Zelt		COY Laboratory Products Inc.
Autoklav	LVSY 50/70	Zirbus Technology
Blotapparatur	Semidry-Blot Trans-Blot® SD	Bio-Rad
FPLC	ÄKTApurifier	Amersham Biosciences
French Press	French® Pressure Cell	SLM Amincon
Geldokumentationsanlage	GelDoc	Bio-Rad
HPLC	1100 Series	Agilent Technologie
pH-Messgerät	C6840 B	Schott
Konzentrationszelle	Amicon 8010	Millipore
Photometer	Ultrospec 2000	Amersham Biosciences
	8453 UV-Visible system	Agilent Technologies
Pipetten	Labmate	Abimed
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore
SDS-PAGE-Apparatur	Mini Protean 3 System	BioRad
Sequenzierer	Genetic Analyzer	Applied Biosystems
	ABI Prism™ 310	
Thermocycler	Mini Cycler	MJ Research
Thermomixer	Vortemp	UniEquip
Ultraschallgerät	UW 2070	Bandelin
Vakuum-Zentrifuge	SpeedvacSPD101B	Savant
Waagen	SBA 52	Scaltec
	BL1500	Sartorius
	BP61S	Mettler
Zentrifugen	Mikro 20	Hettich Zentrifugen
	Centrifuge 5804	Eppendorf
	Biofuge Fresco	Heraeus
	L7-Ultrazentrifuge 65	Beckmann
	RC 5B Plus	Sorval

##### 3.1.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits. Aufgeführt sind Produktbezeichnung und Hersteller.

Produkt	Quelle
DNA-Purification Kit	Biozym
4-Dimethylaminobenzaldehyd	Sigma
Glutathion Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences

PreScission <sup>TM</sup> Protease	Amersham Biosciences
Ethidiumbromidlösung	Roth
Roti-Phenol/Chloroform	Roth
Sterilfilter	Phenomenex / Milipore
Oligodesoxynukleotide	Invitrogen
Lysozym	Sigma
Roti-PVDF-Membran	Roth
Desoxyribonuclease II	Roth
QuikChange <sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Acrylamidstammlösung, Rotiphorese® Gel 30	Roth
Proteaseinhibitor, Complete Mini, EDTA-frei	Roche
Biotin	Pierce
Wachstumsmedien	Serva
Dialyseschlauch SnakeSkin <sup>TM</sup>	Pierce

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen in der Qualität p. a. (*pro analysis*) bezogen: Amersham Pharmacia, Fermentas, Fluka, Gerbu, Merck, New England Biolabs, Promega, J.T.Baker, Roth und Sigma.

### 3.2 Bakterienstämme und Plasmide

In den folgenden Tabelle 3 und Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide aufgeführt.

**Tabelle 3:** Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme. Definiert sind Stammbezeichnung, Genotyp und Bezugsquelle.

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> - Stämme		
DH5α	F <sup>-</sup> <i>supE44D(argF-lac)U169 j80dlacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyr A96 thi-1 relA1</i>	Sambrock <i>et al.</i> , 1989
DH10β	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) j80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araΔ139Δ(ara, leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL (StrR) nupG</i>	Gibco Life Technologies
BL21 CodonPlus <sup>TM</sup> (DE3)-RIL	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS(r<sup>-</sup>B m<sup>-</sup>B) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal (DE3) endA Hte[argU ileY leuW Cam<sup>r</sup> ]</i>	Stratagene
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene
<i>P. aeruginosa</i> -Stamm PAO 1	<i>P. aeruginosa</i> WT	Dunn and Holloway, 1971

**Tabelle 4:** Übersicht über die verwendeten Plasmide. Definiert sind Plasmidbezeichnung, Beschreibung und Bezugsquelle.

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pASK-BVR	pASK-IBA-Derivat; <i>bvr</i> -Gen aus Ratte in <i>Xho</i> I- und <i>Xba</i> I-Schnittstellen des Vektors.	Lagarias (nicht publiziert)
pGEX-6P-1	Expressionsvektor mit dem <i>gst</i> -Gen aus <i>Schistosoma japonicum</i> für N-terminale Proteinfusionen, sowie einer Erkennungssequenz für PreScission Protease, Amp <sup>r</sup> .	Amersham Biosciences
pGEX- <i>bphO</i>	pGEX-6P-1-Derivat; <i>bphO</i> -Gen aus <i>P. aeruginosa</i> in <i>Bam</i> HI- und <i>Sma</i> I-Schnittstellen des Vektors, Amp <sup>r</sup> .	Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel
pGEX- <i>pigA</i>	pGEX-6P-1-Derivat; <i>pigA</i> -Gen aus <i>P. aeruginosa</i> in <i>Bam</i> HI- und <i>Xho</i> I-Schnittstellen des Vektors, Amp <sup>r</sup> .	Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel
pGEX- <i>bphO</i> _H20A_PAO	Austausch des Triplets CAC in den Positionen 58-60 des <i>bphO</i> -Gens gegen GCC. Produziertes Protein trägt an Position 20 ein Alanin statt Histidin.	Diese Arbeit
pGEX- <i>bphO</i> _R13A_PAO	Austausch des Triplets CGC in den Positionen 37-39 des <i>bphO</i> -Gens gegen GCC. Produziertes Protein trägt an Position 13 ein Alanin statt Arginin.	Diese Arbeit
pGEX- <i>bphO</i> _R17A_PAO	Austausch des Triplets CGT in den Positionen 49-51 des <i>bphO</i> -Gens gegen GCU. Produziertes Protein trägt an Position 17 ein Alanin statt Arginin.	Diese Arbeit
pGEX- <i>bphO</i> _N81A_PAO	Austausch des Triplets GAC in den Positionen 241-243 des <i>bphO</i> -Gens gegen GCC. Produziertes Protein trägt an Position 81 ein Alanin statt Asparagin.	Diese Arbeit
pGEX- <i>bphO</i> _K129A_PAO	Austausch des Triplets AAA in den Positionen 385-387 des <i>bphO</i> -Gens gegen GCA. Produziertes Protein trägt an Position 129 ein Alanin statt Lysin.	Diese Arbeit
pASK- <i>bphP</i>	pASK-IBA3-Derivat; <i>bphP</i> -Gen aus <i>P. aeruginosa</i> in <i>Xho</i> I- und <i>Xba</i> I-Schnittstellen des Vektors.	Tasler <i>et al.</i> , 2005

### 3.3 Kulturmedien und Zusätze

#### 3.3.1 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde das Vollmedium nach Luria Bertani (LB)

(Sambrook *et al.*, 2001) verwendet. Allen festen Medien wurde zusätzlich 15 g/l Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugefügt.

LB-Medium	Hefe-Extrakt	5,0	g/l
	Trypton	10,0	g/l
	NaCl	10,0	g/l
SOC-Medium	Caseinpepton (tryptisch)	20,0	g/l
	Hefe-Extrakt	5,0	g/l
	KCl	186,4	mg/l
	NaCl	0,5	g/l
	mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen		
	nach dem Autoklavieren zugeben:		
	1 M MgSO <sub>4</sub> + 1 M MgCl <sub>2</sub>	10,0	ml/l
	2 M Glucose	10,0	ml/l
Bacto® <i>Pseudomonas</i> -Medium	PIA	50,0	g/l
Isolation-Agar	Isolation Agar	6,4	g/l

Für die Kultivierung von *P. aeruginosa* diene das Bacto® *Pseudomonas*-Medium. Der *Pseudomonas* Isolation-Agar wurde in deionisiertem Wasser gelöst und vor dem Autoklavieren 20 ml/l Glycerin als Kohlenstoffquelle zugegeben.

### 3.3.2 Zusätze

Ampicillin und Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurden jeweils in konzentrierten Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und jeweils unter sterilen Bedingungen dem autoklavierten Medium zugesetzt.

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (in Wasser)	100 mg/ml	100 µg /ml
IPTG (in Wasser)	1 M	0,5 mM

## 3.4 Mikrobiologische Techniken

### 3.4.1 Sterilisation

Alle Medien und Puffer wurden bei 121°C für 20 min dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen und Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße des Filters 0,2 µm).

### 3.4.2 Wachstumsbedingungen

#### 3.4.2.1 Aerobe Zellzucht

*E. coli*-Vorkulturen wurden über Nacht (ü.N.) bei 37°C und 180 rpm in Erlenmeyerkolben mit den entsprechenden Zusätzen kultiviert. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden 500 ml LB-Medium mit der Vorkultur in einem Verhältnis von 1:100 beimpft und bei 37°C und 180 rpm in Schikane-Kolben bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,6 kultiviert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression, wobei die Dauer und Temperatur der Expression entsprechend dem zu produzierenden Protein erfolgte.

#### 3.4.2.2 Anaerobe Zellzucht

Anaerobe *E. coli*-Vorkulturen wurden bei 37°C und 100 rpm in dicht geschlossenen Flaschen inkubiert. Eine 100 ml Vorkultur wurde mit *E. coli*-Zellen unter aeroben Bedingungen beimpft. Diese Vorkultur anaerobisierte durch Veratmen des restlichen Sauerstoffs in wenigen Minuten während des Zellwachstums. Die Hauptkultur (1 l) wurde mit 10 ml dieser Vorkultur beimpft, dicht verschlossen und anaerobisierte sich ebenfalls während der Kultivierung. Hierbei diente Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor (10 mM NaNO<sub>3</sub>).

#### 3.4.2.3 Bestimmung von Zelldichte

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD) bei 578 nm im Photometer bestimmt, bei Zelldichten mit einer OD<sub>578nm</sub> ≥ 1 wurde eine 1:10-Verdünnung vermessen. Eine OD<sub>578nm</sub> von 1 entspricht hierbei einer Zellzahl von ca. 10<sup>9</sup> Zellen pro ml.

#### 3.4.2.4 Plattenkulturen von Bakterien

*E. coli*- und *P. aeruginosa*-Kulturen wurden entweder durch Ausstreichen mit einer sterilen Impföse aus einer Glycerinkultur oder durch Verstreichen von 10-100 µl einer Flüssigkultur mit einem Drygalskispatel auf LB-Agar-Platten bzw. *Pseudomonas* Isolation-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend ü.N. bei 37°C inkubiert.

#### 3.4.2.5 Lagerung von Bakterien

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurden 0,7 ml Bakteriensuspension aus einer Vorkultur mit 0,7 ml sterilem Glycerin 80% (v/v)

gemischt und bei - 80°C eingefroren.

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die kompetenten Zellen wurden nach der Rubidium-Chlorid-Methode (Hanahan, 1983) hergestellt. *E. coli*-Zellen (DH10 $\beta$  und BL21CodonPlus<sup>TM</sup> (DE3)-RIL) wurden unter aeroben Bedingungen in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,6 angezogen und dann bei 5.000 rpm für 10 min zentrifugiert (Sorvall, Rotor SLA 1500). Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem TFB1-Medium resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend nochmals 5 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge 5804, A-4-44-Rotor). Das Pellet wurde in einem Volumenteil, bezogen auf das Sedimentvolumen, in kaltem TFB2-Puffer resuspendiert (1:25) und 15-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Pellet in Aliquots zu je 50  $\mu$ l aliquotiert und bei - 80°C eingefroren.

TFB1-Puffer	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	RbCl	100 mM
	Glycerin	15 % (w/v)
	pH 5,8 titriert mit Essigsäure	
TFB2-Puffer	MOPS-KOH	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	RbCl	100 mM
	Glycerin	15 % (w/v)
	pH 6,5 titriert mit 1 M KOH	

#### 3.5.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte durch Hitzeschock. Für eine Transformation wurden 50  $\mu$ l der kompetenten Zellen mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45 sek Hitzeschock bei 42°C und weiteren 2 min Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 ml sterilem SOC-Medium (Kapitel 3.3.1). Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C und 500 rpm inkubiert und anschließend für 2-5 min bei 2.700 rpm (Mikro 20, Hettich Zentrifugen) und 4°C zentrifugiert. Etwa 700  $\mu$ l des Mediums wurde entfernt. Die Zellen wurden in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert, je einmal 10  $\mu$ l und 100  $\mu$ l auf LB-Agar-Platten (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

### 3.5.3 Plasmidpräparation

Von einer *E. coli*-Vorkultur wurden 1,5 ml für 5 min bei 13.000 rpm (Mikro 20, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 200 µl einer NaOH/SDS-Lösung hinzu gegeben, vorsichtig gemischt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Lyse durch Zugabe von 150 µl Natriumacetat-Lösung gestoppt und 5 min auf Eis inkubiert. Die erhaltene Lösung wurde 5 min bei RT und 13.000 rpm (Mikro 20, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden 800 µl Isopropanol zugegeben, die Lösungen gut vermischt, 5 min bei RT inkubiert und für 5 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert (Mikro 20, Hettich Zentrifugen). Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 30 µl TE-Puffer gelöst. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

GTE-Puffer	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA	25 mM
	RNase	100 mg/ml
TE-Puffer	Tris -HCl pH 8,0	100 mM
	EDTA	10 mM
NaOH/SDS-Lösung	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (v/v)
	Lösung immer frisch ansetzen	
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat	3 M
	pH 4,8 titriert mit Essigsäure	

### 3.5.4 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung erfolgte photometrisch durch Messung der OD bei 260, 280 und 320 nm. Eine OD<sub>260nm</sub> von 1,0 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrock *et al.*, 2001). Bei einem Faktor von 1,8 und 2,0 zwischen Abs<sub>260nm</sub> und Abs<sub>280nm</sub> kann die DNA als rein betrachtet werden.

### 3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente werden im elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihrer Länge aufgetrennt. Zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten wurden 1%-ige Agarosegele verwendet. Die Trennung erfolgte in TAE-Laufpuffer durch das

Anlegen einer elektrischen Spannung (200 V). Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und geliert beim Abkühlen. Ethidiumbromid-Lösung (0,005% (v/v)) wurde vor dem Gießen der Gele hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und kann mittels Fluoreszenz über eine Lichtquelle (Geldoc) von  $\lambda = 312 \text{ nm}$  detektiert werden. Die Größen und Mengenbestimmung erfolgte durch Vergleiche mit zusätzlich aufgetragenen Größen- bzw. Mengenstandards, wie z.B. GeneRuler™ Ladder Mix der Firma Fermentas.

TAE-Puffer	Tris-Acetat pH 8,5	40 mM
	EDTA	1 mM
Agarosegel	Agarose in TAE-Puffer	1 % (w/v)
Probenpuffer	Bromphenolblau	350 $\mu\text{M}$
	Xylen Cyanol FF	450 $\mu\text{M}$
	Orange G	0,25 % (w/v)
	Saccharose in Wasser	115 mM

### 3.5.6 Ortsgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Für die ortsgerichtete Mutation des *bphO*-Gens wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Als Ausgangs-DNA diente das Plasmid pGEX-6P1-*bphO*. Es wurde dabei mittels PCR-Technik und unter Verwendung von Oligonukleotiden (Invitrogen), die die gewünschten Basenaustausche trugen, das modifizierte Gen amplifiziert (Tabelle 5). Da die DNA aus *P. aeruginosa* einen sehr hohen G-C-Gehalt aufweist, wurde abweichend vom Standardprotokoll 8% DMSO zu jedem Reaktionsansatz gegeben.

Durch eine Restriktion des PCR-Produktes mit *DpnI* für ein bis zwei Stunden bei 37°C wurde methylierte DNA abgebaut. Abschließend wurde die Plasmid-DNA mittels  $\text{CaCl}_2$ -Methode in superkompetente Zellen *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Dabei ligierte die *E. coli*-DNA-Ligase die noch offenen Enden der zirkulären Amplifikate. Von den erhaltenen Klonen wurde mittels alkalischer Lyse Plasmid-DNA präpariert (Kapitel 3.5.3) und durch Sequenzierung (Kapitel 3.5.7) auf Korrektheit der Mutation überprüft. Einstellungen für die PCR, Volumina und Inkubationszeiten wurden nach Angaben des Herstellers gewählt.

**Tabelle 5:** Primer für die Ortsgerichtete Mutagenese. Ausgetauschte Basen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz
R13Afor	5'-TCGCCGCACTC <u>GCC</u> GACGCCACCCG-3'
R13Arev	5'-AGCGGCGTGAG <u>CGG</u> CTGCGGTGGGC-3'
R17Afor	5'-GCGACGCCAC <u>GCT</u> GACCTGCACGC-3'
R17Arev	5'-CGCTGCGGTGG <u>GCA</u> CTGGACGTGCG-3'



N81Afor	5'-TGGCTGGAAAGCGCCCTGCTGGCCG-3'
N81Arev	5'-ACCGACCTTTCGGACGACACCGGC-3'
K129Afor	5'-CGCGTATCTCTACGCACGACTAGCTCC-3'
K129Arev	5'-GGAGCTAGTCGTGCGTAGAGAGATACGCG-3'
H20Afor	5'-ACCCGTGACCTGGCCGCAGAACTGGAC-3'
H20Arev	5'-TGGGCACTGGACCGGCGTCTTGACCTG-3'

### 3.5.7 Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach einer modifizierten Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die hierfür benötigten Primer sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Seqlab (Göttingen) oder mit Hilfe des Sequenziergerätes Genetic Analyzer ABI Prism<sup>TM</sup> 310 (Applied Biosystems). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm SeqManII (DNASTAR, Madison, WI, USA) ausgewertet.

Sequenzierreaktionsansatz:	Premix	2 µl
	5x Puffer (Perkin Elmer)	2 µl
	Primer (10 pmol/µl)	1 µl
	dsDNA	1-3 µg/kb
	H <sub>2</sub> O auf 10 µl auffüllen	
Amplifikationsbedingungen:	96°C	1 min
	96°C	30 sek
	50°C	15 sek
	60°C	4 min
	25 Zyklen	

Die Sequenzier-PCR wurde nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Anschließend wurde die Sequenzierreaktion in 90 µl sterilem Wasser aufgenommen und die DNA mit 10 µl Natriumacetat, 250 µl 100% Ethanol und 1 µl Glycogen gefällt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm (Mikrofuge 20, Hettich) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 12,5 µl HiDi-Puffer (Perkin Elmer Applied Biosystems) resuspendiert und mit Hilfe des Sequenziergerätes Genetic Analyzer ABI Prism<sup>TM</sup> 310 (Applied Biosystems) ausgewertet.

**Tabelle 6:** Primer zur Sequenzierung.

Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz
pGEX5'-Sequencing	5'-d[GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG]-3'
pGEX3'-Sequencing	5'-d[CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG]-3'
<i>bph</i> OR129seqfor	5'-GTTGCCTGGCCGTAGCCCTGC-3'
<i>bph</i> OR129seqrev	5'-CAACGGACCGGCATCGGGACG-3'

## 3.6 Biochemische Methoden

### 3.6.1 Rekombinante Darstellung der Hämoxygenase BphO

#### 3.6.1.1 Rekombinante Proteinsynthese

Die zur Produktion der rekombinanten Hämoxygenasen BphO und PigA aus *P. aeruginosa* eingesetzten Plasmide pGEX-*bphO* und pGEX-*pigA* wurden bereits von Dr. Frankenberg-Dinkel konstruiert. Die *bphO*- und *pigA*-Gene werden in diesem System stromaufwärts als N-terminale Fusion mit dem Glutathion S-Transferase-Gen (GST) aus *S. japonicum* exprimiert. Die Expression wird durch einen IPTG induzierbaren *tac*-Promotor kontrolliert. Als Selektionsmarker enthalten die Plasmide ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Die Erkennungssequenz für die PreScission Protease ist stromaufwärts der klonierten *bphO* und *pigA* lokalisiert. Exprimiert wurde in dem proteasedefizienten *E. coli*-Stamm BL21CodonPlus<sup>TM</sup>(DE3)-RIL. Alle durch QuikChange<sup>TM</sup> erstellten BphO-Varianten wurden ebenfalls in diesem System produziert.

Puffer für chromatographische Proteinreinigung:

PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	NaCl	140 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
	pH 7,4 titreirt mit NaOH	
Elutionspuffer	Tris-HCl pH 7,0	50 mM
	Glutathion <sub>red.</sub>	10 mM
PreScission <sup>TM</sup> Protease-Verdau-Puffer	Tris-HCl pH 7,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
Hepes-Puffer	Hepes	25 mM
	KCl	100 mM
	Glycerin	10 %
	pH 7,5 titriert mit KOH	

#### 3.6.1.2 Zellkultivierung

Aus einer 250 ml Übernachtskultur wurden 6 x 500 ml sterilisiertes LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in einer 1:100 Verdünnung angeimpft und bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,6 bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Danach wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG die Expression der *gst-bphO*-Genfusion induziert. Die Expression wurde ü.N. (ca. 20 h) bei 17°C und 180 rpm fortgesetzt. Die Zellen wurden bei 5.000 rpm (Sorvall, Rotor SLA 3000) und 4°C für 10 min geerntet.

### 3.6.1.3 Zellaufschluß

Je 15 g Zellen wurden in 20 ml kaltem Zellaufschlußpuffer resuspendiert und in drei Durchläufen in der French Press (Thermo Electron) bei 4°C mit einem Druck von 23.000 psi (ca. 82 bar) aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde für 60 min bei 50.000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Beckman L7 Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 70.1). Alternativ wurden die Zellen durch Behandlung mit Ultraschall (Bandelin Sonoplus, 3x 5 min, 70% Amplitude, Kegelspitze KE73) aufgeschlossen.

### 3.6.1.4 Erste Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose™ 4B

Nach der Äquilibration der mit 10 ml Glutathion-Sepharose™ 4B (Amersham Bioscience) gepackten Säule (1,0 cm x 5,0 cm) mit 5 Säulenvolumen PBS-Puffer wurde der filtrierte cytoplasmatische Extrakt auf die Säule aufgetragen. Nach einem Spülschritt von 10 Säulenvolumen PBS-Puffer wurde das GST-BphO-Fusionsprotein mit Elutionspuffer eluiert. Die Elution wurde per SDS-PAGE verfolgt.

### 3.6.1.5 Protease-Verdau

Zur Abspaltung des GSTs vom Fusionsprotein wurde die Proteinlösung mit 140 U PreScission™ Protease (Amersham Biosciences) je 20 mg Protein versetzt und ü.N. bei 4°C in PreScission Protease-Verdau-Puffer inkubiert. Der Verlauf des Verdaus wurde per SDS-PAGE verfolgt.

### 3.6.1.6 Zweite Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose™ 4B

In diesem Schritt wurden der abgespaltene GST-tag, unverdautes Fusionsprotein und die PreScission™ Protease, die ebenfalls mit GST fusioniert ist, an das Affinitätsmaterial gebunden. Das abgespaltene BphO befand sich im Durchlauf. Dazu wurde nach Äquilibration mit 5 Säulenvolumen PBS-Puffer die verdaute Proteinlösung aufgetragen und der BphO enthaltende Durchlauf aufgefangen. Abschließend wurde die Säule mit Elutionspuffer gewaschen, wodurch GST-tag, ungeschnittenes Fusionsprotein und die PreScission Protease von der Matrix eluiert wurden. Die Elution wurden per SDS-PAGE verfolgt.

### 3.6.1.7 Dialyse

Zur Entsalzung, Entfernung von Glutathion und Umpufferung wurde die Proteinlösung bei einem Volumen kleiner als 5 ml in Dialyseknöpfen und bei größeren Volumina in Dialyseschläuchen ü.N. bei 4°C gegen 1 l Hepes-Puffer dialysiert. Die Ausschlussgrenze der verwendeten Dialyseschläuche betrug 10 kDa.

Dialysepuffer:	Hepes	25 mM
	KCl	100 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	pH 7,5 titriert mit KOH	

#### 3.6.1.8 Konzentrierung

Die nach dem Proteaseverdau erhaltenen Proteinlösungen (ca. 20 ml) wurden in einer 10 ml-Rührzelle (Amicon) mit einer YM10-Membran (Amicon) bei  $3 \times 10^5$  Pa auf jeweils 2,5 ml oder 1,5 ml konzentriert.

#### 3.6.2 Anaerobe Proteinreinigung

Die strikt anaerobe Reinigung von rekombinantem BphO aus *P. aeruginosa* wurde wie oben beschrieben (Kapitel 3.6.1) unter Schutzatmosphäre in einem Anaeroben-Zelt durchgeführt.

### 3.7 Proteincharakterisierung

#### 3.7.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer molaren Masse aufgetrennt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine in einem großporigen Sammelgel (pH 6,8) fokussiert und dann im Trenngel (pH 8,8) aufgetrennt, wodurch die Bandenschärfe und Trennleistung deutlich erhöht wird (Righetti, 1990). Es wurden 10 %-ige Gele für die Auftrennung von GST-BphO und 12,5 %-ige Gele für die Auftrennung von BphO verwendet (Bio Rad Mini Protein 3 System, 8,4 cm x 7,3 cm x 0,05 cm). 5 µl Probenmaterial wurde mit 10 µl Probenpuffer vermischt, zur vollständigen Denaturierung 5 min auf 95°C erhitzt und dann 1 min bei 13.000 rpm (Mikro 20, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 200 V. Durch anschließende Inkubation in einer Färbelösung und darauf folgender Entfärbung wurden die Proteine sichtbar gemacht. Zur Konservierung wurden die SDS-Gele zwischen zwei Cellophanfolien in einem Trockenrahmen getrocknet.

Puffer für die SDS-Gelelektrophorese:

4xSammelgelpuffer	SDS	0,4 % (w/v)
	Tris-HCl, pH 6,8	1,5 M
	in deion. Wasser	
4xTrenngelpuffer	SDS	0,4 % (w/v)

	Tris-HCl, pH 8,8 in deion. Wasser	1,5 M
APS-Lösung	APS in deion. Wasser	10,0 % (w/v)
Sammelgel 5,25 % (für 4 Minigele)	Acrylamid-Stammlösung Sammelgelpuffer deion. Wasser TEMED APS-Lösung	1,4 ml 2,0 ml 4,6 ml 20,0 µl 30,0 µl
Trenngel 10 % (4 Minigele)	Acrylamid-Stammlösung Trenngelpuffer deion. Wasser TEMED APS-Lösung	10,0 % 5,3 ml 4,0 ml 6,7 ml 8,0 µl 80,0 µl
Trenngel 12,5 % (4 Minigele)	Acrylamid-Stammlösung Trenngelpuffer in deion. Wasser TEMED APS-Lösung	12,5 % 6,7 ml 4,0 ml 5,3 ml 8,0 µl 80,0 µl
Elektrophoresepuffer	Glycin Tris-HCl, pH 8,8 in deion. Wasser	385,0 mM 50,0 mM
Probenpuffer	Glycerin β-Mercaptoethanol SDS Bromphenolblau Tris-HCl, pH 6,8	40,0 % (w/v) 2,0 mM 110,0 mM 3,0 mM 100,0 mM
Färbelösung	Essigsäure Coomassie BrilliantBlueG250 Isopropanol in deion. Wasser	10,0 % (v/v) 0,25 % (w/v) 30,0 % (v/v)
Entfärbelösung	Ethanol Essigsäure in deion. Wasser	30,0 % (v/v) 10,0 % (v/v)
Proteinmarker	Protein Molekular Weight Marker (Fermentas) Prestained Protein Ladder (Fermentas)	

### 3.7.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer gereinigten Proteinlösung kann bei bekannter Aminosäurenzusammensetzung des Proteins mit der Methode von Gill und von Hippel bestimmt werden (Gill und von Hippel, 1989). Die Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Cystein (Cys) absorbieren bei 280 nm. Aus der Häufigkeit dieser Aminosäuren im Protein kann der dekadische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  mit folgender Gleichung berechnet

werden:

$$\epsilon_{280} = (n_{Trp} \cdot 5690 + n_{Tyr} \cdot 1280 + n_{Cys} \cdot 120) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$n_x$ : Anzahl der betreffenden Aminosäuren im Protein  
 $\epsilon_{280}$ : molekularer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm

Mit Hilfe des dekadischen Extinktionskoeffizienten kann nun die Proteinkonzentration  $c$  der Protein-Lösung berechnet werden:

$$c = M_r \cdot A_{280} / \epsilon_{280} \cdot d$$

$c$ : Proteinkonzentration in mol/l  
 $M$ : Molekulargewicht des Proteins in g/mol  
 $A_{280}$ : Absorption bei 280 nm  
 $\epsilon_{280}$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in  $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
 $d$ : Schichtdicke der Küvette in cm

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der verschiedenen Lösungen wurde die  $A_{280}$  photometrisch bestimmt. Der molare Absorptionskoeffizient der BphO beträgt:

$$\epsilon = 41488 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Da die berechnete relative molekulare Masse der BphO 21, 464 pro Untereinheit beträgt, entsprach eine Absorption von 1,0 einem Proteingehalt von ca. 0,52 mg/ml. Vor der Messung wurde das Photometer gegen den jeweiligen Puffer abgeglichen.

### 3.7.3 Analytische Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie (GPC) werden Proteine aufgrund von Größenunterschieden beim Durchgang durch eine Gelmatrix mit definierter Porengröße getrennt. In dieser Arbeit wurde für analytische Gelpermeationschromatographie eine Superdex™ 200 HR 10/30 Säule (Pharmacia) verwendet. Die Säule wurde mit dem entsprechenden GPC-Puffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min äquilibriert. Zur Eichung wurden Markerproteine mit bekannter  $M_r$  (Apoferritin 443.000;  $\beta$ -Amylase 200.000; Alkoholdehydrogenase 150.000; Ovalbumin 45.000 und Carboanhydrase 29.000) auf die Säule aufgetragen und ihre Elutionsvolumina spektroskopisch verfolgt. Bei den Experimenten unter reduzierenden Bedingungen wurde dem GPC-Puffer DTT als Reduktionsmittel zugefügt.

GPC-Puffer:	Hepes	25 mM
	KCl	100 mM
	DTT	1 mM
	pH 7,5 titriert mit KOH	

### 3.7.4 Bestimmung der Aktivität von BphO

#### 3.7.4.1 Hämtitration

Hämproteine zeigen nach Bindung ihres Cofactors/Substrates charakteristische Absorptionseigenschaften. Für die Titration wurde eine 10  $\mu\text{M}$  BphO-Lösung hergestellt. In diese wurde Häm-Lösung in 1  $\mu\text{l}$  Aliquots einer 4,6 mM Hämlösung zu einer Häm-Endkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  titriert und die Proben 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde nach jedem Titrationsschritt ein Spektrum aufgenommen. Als Referenzprobe wurde Hepes-Puffer verwendet, der die entsprechende Hämmenge enthielt (Kapitel 3.6.1.7). Eine 4,6 mM Hämlösung wurde hergestellt, indem 15 mg Häm in 500  $\mu\text{l}$  50 mM NaOH gelöst und anschließend in 4,5 ml 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen wurde.

#### 3.7.4.2 Ermittlung des Extinktionskoeffizienten des BphO-Häm-Komplexes

Der Extinktionskoeffizient des BphO-Häm-Komplexes wurde mittels der Pyridin-Hämochrom-Methode ermittelt (Berry und Trumpower, 1987; Wilks, 2002). Der isolierte BphO-Häm-Komplex (500  $\mu\text{l}$ ) wurde in Anwesenheit von Pyridin (62,5  $\mu\text{l}$ ) und 0,5 N NaOH (62,5  $\mu\text{l}$ ) zu einem Pyridin-Hämochrom-Komplex umgewandelt. Das Spektrum des oxidierten Pyridin-Hämochrom wurde bei 557 nm aufgenommen. Durch Zugabe von Dithionit in 5-fachem Überschuss wurde das Pyridin-Hämochrom zu Ferri-Pyridin-Hämochrom ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reduziert und erneut ein Spektrum bei 557 nm aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration des Häms wie folgt berechnet:

$$c = \Delta A_{557} / \epsilon_{557}$$

$\epsilon_{557\text{nm}}$ : Absorptionskoeffizient für Häm: 34.530 [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]  
 $c$ : Hämkonzentration [M]  
 $\Delta A_{557\text{nm}}$ :  $A_{\text{red}557\text{nm}} - A_{\text{ox}557\text{nm}}$

Der Extinktionskoeffizient für den BphO-Häms-Komplexes berechnet sich über das Lambert-Beer-Gesetz wie folgt:

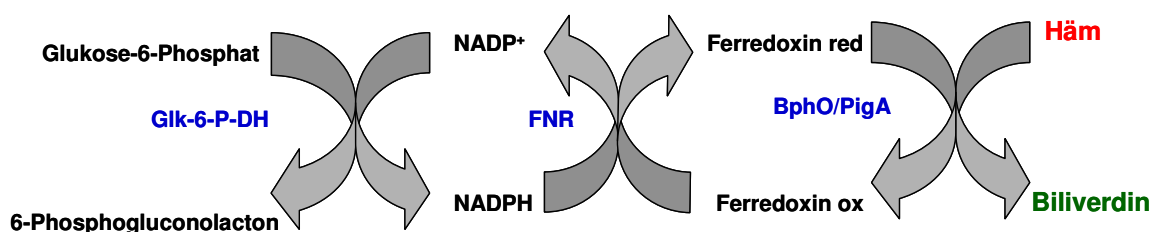
$$\epsilon = \Delta A_{557} / c[\text{Häm}] \cdot d$$

$d$ : Schichtdicke der Küvette [cm], (hier 1 cm)  
 $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]  
 $\Delta A_{557\text{nm}}$ :  $A_{\text{red}557\text{nm}} - A_{\text{ox}557\text{nm}}$   
 $c[\text{Häm}]$ : Hämkonzentration [M]

### 3.7.5 BphO-Aktivitätstest

#### 3.7.5.1 Prinzip des Enzymtests

BphO konnte mittels eines gekoppelten Enzymtests *in vitro* getestet werden (Cornejo *et al.*, 1998, Muramoto *et al.*, 2002). Unter den im Enzymtest herrschenden Bedingungen werden die hierfür benötigten Elektronen von einem NADPH-regenerierenden System zur Verfügung gestellt. Das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glk-6-P-DH) entzieht seinem Substrat Glukose-6-Phosphat Elektronen und überträgt diese auf  $\text{NADP}^+$ . Das Enzym Ferredoxin:NADPH Oxidoreduktase (FNR) überträgt die Elektronen vom entstandenen NADPH auf Ferredoxin. Ferredoxin wird von BphO als Elektronenlieferant für die Reduktion von Häm genutzt (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des gekoppelten Enzymtests. Glk-6-P-DH, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; FNR, Ferredoxin:NADPH:Oxidoreduktase; BphO/PigA: Hämoxigenasen.

#### 3.7.5.2 Bildung und Reinigung des BphO-Häm-Komplexes

Der BphO-Häm-Komplex wurde wie oben beschrieben (Kapitel 3.7.4.1) im Verhältnis 1:3 präpariert. Um ungebundenes Häm vom BphO-Häm-Komplex zu trennen, wurde dieser über eine Hydrxylapatit-Säule (0,5 x 1,0 cm) gereinigt. Dazu wurde die Säule zuerst mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 äquilibriert und anschließend der BphO-Häm-Komplex mit 200 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 eluiert. Die Fraktionen wurden sowohl mit SDS-PAGE als auch mittels Spektroskopie analysiert. Die BphO-Häm-Komplex enthaltenden Fraktionen wurden gegen Hepes-Puffer dialysiert.

### 3.7.6 Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des BphO-Häm-Komplexes

#### 3.7.6.1 Gekoppelter Enzymtest

Die Bedingungen für die Häm-Umsetzung durch BphO wurden im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet. Als beste Bedingung wurde folgender Ansatz ermittelt (Tabelle 7).



**Tabelle 7:** Gekoppelter Enzymtest.

Komponenten	Konzentration
BphO-Häm-Komplex	10 $\mu$ M
BSA	0,15 mg/ml
Spinat Ferredoxin	4,6 $\mu$ M
Spinat Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Oxidoreduktase	0,025 U/ml

Alle Komponenten wurden in 25 mM Hepes-KOH, 100 mM KCl, 10% (v/v) Glycerin pH 7,5 gemischt (500  $\mu$ l Endvolumen) und die Reaktion durch Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems gestartet. Anschließend wurden die spektralen Änderungen zwischen 300 und 800 nm für 30 min bei 37°C verfolgt (8453 UV visible System Agilent Technologies).

NADPH-regenerierendes System:

GluKose-6-Phosphat	100	mM
NADP <sup>+</sup>	25	mM
GluKose-6-Phosphat Dehydrogenase	500	U/ml

Alle Stammlösungen wurden in 5 mM Na-Citrat-Puffer pH 7,4 hergestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Elektronendonatoren für die Reduktion von Häm:BphO untersucht:

Ferredoxin <i>Porphyra</i> (Sigma)	4,6 $\mu$ M
Ferredoxin <i>Clostridium</i> (Sigma)	4,6 $\mu$ M
Humane Cytochrom P450 Reduktase (Merck Biosciences, Bad Soden)	2,5 $\mu$ M
Flavodoxin (Sigma)	53,3 $\mu$ M
Na-Ascorbinsäure	5,0 mM
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)	5,0 mM

Reduziertes Flavodoxin wurde unter anaeroben Bedingungen wie folgt vorbereitet:

Flavodoxin	53,3	$\mu$ M
EDTA	15,0	mM
Tris-HCl, pH 8,0	15,0	mM
Natriumoxalat	10,0	mM
Deazariboflavin	6,6	$\mu$ M

Alle Lösungen wurden unter anaeroben Bedingungen gemischt und bestrahlt (250 W).

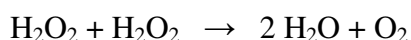
### 3.7.6.2 Gekoppelte Oxidation des BphO-Häm-Komplexes

Die nicht-enzymatische Spaltung des Häms ist für bestimmte Häm-bindende Proteine wie z.B. Myoglobin, Cytochrom<sub>b5</sub>, und Cytochrom<sub>b562</sub> beschrieben worden (O'Carra und Colleran, 1969; Sigman *et al.*, 2001; Rice *et al.*, 1999). Die Oxidation des Häms erfolgt durch Hydroperoxidradikale, die durch eine Protonierung des Superoxidanions entstehen. Hämproteine oder Eisen-Porphyrine reagieren mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter geeigneten Bedingungen zu

*meso*-Hydroxyhämproteinen und Verdohämen (Sano *et al.*, 1986; Bonett *et al.*, 1973; Avila *et al.*, 2003). Diesen Prozess der Oxidation von Häm nennt man gekoppelte Oxidation (Lemberg *et al.*, 1956). Um die spektralen Änderungen der Spaltung des Häms im BphO-Häm-Komplex zu testen, wurde 30  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dem BphO:Häm-Komplex gegeben.

### 3.7.6.3 Umsetzung des BphO-Häm-Komplexes in Anwesenheit von Katalase

Katalase katalysiert die Dismutierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff und verhindert somit die Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches von den Hydroperoxidradikalen gebildet wird.



Um zwischen gekoppelter Oxidation und enzymatischer Spaltung des BphO:Häms zu unterscheiden, wurden Experimente in Anwesenheit von Katalase aus *Aspergillus niger* (Sigma) durchgeführt. Zu den Ansätzen wurde Katalase im molaren Verhältnis 0,5:1 (Katalase : BphO:Häm) vor der Zugabe eines Reduktanden hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit dem NADPH-regenerierenden System gestartet und photometrisch verfolgt.

### 3.7.6.4 Umsetzung des BphO-Häm-Komplexes in Anwesenheit von Eisenchelatoren

Ein wichtiger Faktor für die BV-Produktion bei der enzymatischen Umsetzung des Häms ist die Anwesenheit von Eisenchelatoren, die die Freisetzung des Eisens fördern. Dieser Effekt wurde für die Hämoxygenasen aus *Cyanidium caldarium* (Rhie and Beale, 1995) und aus *Arabidopsis thaliana* (Muramoto *et al.*, 2002) beschrieben.

Folgende Eisenchelatoren wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet:

Desferrioxamin	10 mM
Tiron	10 mM
o-Phenanthrolin	10 mM

Alle Eisenchelatoren wurden von der Firma Sigma bezogen.

## 3.7.7 Auswertung des gekoppelten Enzymtests mittels HPLC

### 3.7.7.1 Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse

Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte mittels HPLC-Analysen. Hierfür wurde der Enzymtest mit C18 SepPak Light Kartuschen (Waters) aufbereitet. Die SepPak-Säule wurde mit folgenden Lösungen äquilibriert: 3 ml Acetonitril, 3 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 3 ml 50 mM N-Methylmorpholin (pH 7,7 titriert mit 50%-iger Essigsäure). Anschließend wurde der Test-

ansatz auf die Säule gegeben und mit je 3 ml N-Methylmorpholin und 0,1% Trifluor-Essigsäure (TFA) gewaschen. Reaktionsprodukte (Biliverdine) wurden mit 2 ml Acetonitril eluiert und die Flüssigkeit mittels Vaccum-Zentrifugation bei 37°C verflüchtigt.

#### 3.7.7.2 Analyse der Reaktionsprodukte mittels HPLC

Zur Auswertung des gekoppelten Enzymtests wurden die Proben über eine Ultracarb 5µm ODS20 4,6 x 250 mm (Phenomenex) Säule mittels HPLC analysiert (Agilent Technologies, 1100 Series). Für diese Analyse wurde eine Methode zur Auftrennung linearer Tetrapyrrole verwendet, bei der die Absorption bei 380 und 650 nm gemessen wird (Biliverdin-Absorptionsmaxima). Als Laufmittel wurde Aceton:20 mM Ameisensäure (50/50, (v/v)) verwendet, die Flussrate betrug 0,6 ml/min. Der getrocknete Ansatz des aufbereiteten Enzymtests wurde in 10 µl DMSO resuspendiert und mit 200 µl der mobilen Phase verdünnt. Bevor der Ansatz auf die Säule gegeben wurde, erfolgte eine Filtration mittels eines 0,45 µm-Polytetrafluorethylen Filters.

#### 3.7.8 Biliverdinreduktase-Test

Um den BphO:BV-Komplex zu charakterisieren, wurde ein Biliverdinreduktase-Test durchgeführt. Biliverdinreduktase (BVR) katalysiert die Reaktion von BV IX $\alpha$  zu Bilirubin (BR), welches bei 450 nm ein Absorptionsmaximum besitzt.

Das gereinigte BphO:BV wurde mit einem Aliquot rekombinanter BVR aus Ratte (zellfreies Extrakt einer Expressionkultur) versetzt (Expressionsklon wurde freundlicherweise von Dr. J. C. Lagarias, University of California at Davis, USA, zur Verfügung gestellt). Die Reaktion wurde durch Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems (Kapitel 2.7.6.1) gestartet und die spektralen Änderungen zwischen 300 nm und 800 nm aufgezeichnet.

### 3.8 NMR-Spektroskopie

BphO aus *P. aeruginosa* wurde mittels NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) charakterisiert. Dies wurde an der Universität Kansas im Institut für Chemie in Lawrence, Kansas USA, unter freundlicher Mithilfe von Mario Rivera aufgenommen und ausgewertet wurde. Für die Herstellung von  $^{13}\text{C}$  markiertem Häm wurden *E. coli*-Zellen in einem Minimalmedium mit  $\delta$ -[5- $^{13}\text{C}$ ]-, [5- $^{13}\text{C}$ ]- und [1,2- $^{13}\text{C}$ ]-Aminolevulinsäure kultiviert. Die Expression und Reinigung von  $^{13}\text{C}$ -Häm erfolgte nach den Protokollen für die Biosynthese des mitochondrialen Membrancytochrom *b*<sub>5</sub> aus Ratte (Rivera und Walker, 1995; Zeng *et al.*, 2004; Rivera und Caignan, 2004). Für die Strukturaufklärung wurden BphO und PigA

Proteine mit frisch präpariertem  $^{13}\text{C}$ -Häm inkubiert. Die Spektren von den mit  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  markierten BphO und PigA Proteinen wurde am Varian Unity Inova Spektrometer bei einer Frequenz von 599,740 MHz für  $^1\text{H}$  und 150,817 MHz für  $^{13}\text{C}$  aufgenommen. Die Gradientenkalibrierung erfolge mit Hilfe eines Deuterium enthaltenen Phosphatpuffer (pH 7,0) mit Spuren von undeutertem Wasser. Die Bedingungen, unter denen die Experimente durchgeführt wurden, sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Bedingungen für die NMR-Spektroskopie-Experimente.

	Markierung mit $^1\text{H}$	Markierung mit $^{13}\text{C}$
Referenz	Wasserpeak bei 4,8 ppm	Dioxanlösung bei 66,66 ppm
Signalreihen	10000 Punkte	12.000 Punkte
Resonanzfrequenz	24 kHz	60 kHz
Anregungszeit	150 ms	100 ms
Relaxationszeit	200 ms	25 ms
Gradientenwert	1024 Scans	400.000 Scans

Für die HMQC-Spektren (heteronukleare Einquantenkohärenz) wurde das BphO Protein mit dem an Methyl-,  $\beta$ -Propionat-,  $\beta$ -Vinyl- und *meso*-Kohlenstoffen markierten Häm inkubiert. Alle HMQC-Messungen wurden bei Resonanzfrequenz von 24 kHz für  $^1\text{H}$  und von 50 kHz für  $^{13}\text{C}$  und einer Relaxationszeit von 200 ms durchgeführt.

Für die Strukturbestimmung wurden WEFT-NOESY-Spektren (*nuclear overhaussen and exchange spectroscopy*) mit Kern-Overhauser-Effekt und Austausch aufgenommen. Alle 2D-Aufnahmen der WEFT-NOESY-Spektren wurden bei einer Resonanzfrequenz von 24 kHz durchgeführt. Zur Detektionen der Spektren wurden bei  $t_1$  256 Momentaufnahmen und bei  $t_2$  2.000 Momentaufnahmen detektiert. In Abhängigkeit von der Probenkonzentration wurden bei jedem Gradientenwert Spektren von 352 Scans pro  $t_1$  aufgenommen. Die Mischzeit betrug 40 ms.

### 3.9 Differenzspektroskopie

Um die Assemblierung von Chromophoren an Phytochrom *in vitro* zu untersuchen, wurden für Phytochrome charakteristische Differenzspektren aufgenommen. Hierfür wurden 20  $\mu\text{M}$  apo-BphP mit 40  $\mu\text{M}$  Chromophor in einem Endvolumen von 500  $\mu\text{l}$  30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Absorptionsspektren wurden nach 3 min Bestrahlung mit hellrotem Licht (630 nm, Pfr-Spektrum) und nach 3 min Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (750 nm, Pr-Spektrum) in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  aufgenommen. Durch Subtraktion des Pfr- vom Pr-Spektrum wird das Differenzspektrum berechnet.

### 3.10 Untersuchungen zur Interaktion zwischen BphO und BphP

#### 3.10.1 Immunopräzipitation

Ein Anti-BphO-Serum aus Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec (Belgien) produziert. Die Immunisierung erfolgte mit Lösungen der rekombinant produzierten und gereinigten Proteine. Dazu wurden jeweils 1 mg BphO aus *P. aeruginosa* in 25 mM Hepes-KOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin für die Immunisierung von zwei Kaninchen pro Antigen eingesetzt. Den Tieren wurden jeweils 125 µg Antigen (BphO) in den oben angegebenen Puffern zusammen mit Freund's Adjuvanz nach 0, 14, 28 und 56 Tagen injiziert.

##### 3.10.1.1 *In vivo*-Immunopräzipitation

Für die *in vivo* Immunopräzipitation wurden ca. 0,5 g bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,6 geerntete, *P. aeruginosa* PAO-1-Zellen in 5 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und durch Ultraschall (KE76; 70% Amplitude; 2 min, 0,5 s Puls, 0,5 s Pause) unter externer Eiskühlung aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde anschließend zentrifugiert (1 h, 50.000 rpm, 4°C; Beckmann L7 Ultrazentrifuge, Ti70.1-Rotor). Je 500 µl des Zellextraktes wurden mit 2,5 µl des Serums versetzt und für 90 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 15 µl einer 1:1 Aufschlammung von in Aufschlusspuffer äquilibrierter Protein-A-Sepharose (PAS) (Amersham Pharmacia) zugegeben und für weitere 90 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation der Ansätze für 10 min bei 14.000 rpm (Mikro 20, Hettich Zentrifugen) und 4°C wurden die Pellets dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand sorgfältig abgenommen. Die gewaschenen Pellets wurden mit je 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 3.7.1).

Lösungen für die Immunopräzipitation:

Aufschlusspuffer	Tris-HCl, pH 7,3	100 mM
	NaCl	10 mM
Waschpuffer	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	DTT	10 mM
	NP-40	0,5 % (v/v)
Schwyzer-Puffer	Tris-HCl, pH 9,0	100 mM
	LiCl	500 mM
	Triton X-100	1 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)
	immer frisch ansetzen	

### 3.10.1.2 *In vitro*-Immunopräzipitation

Die Endkonzentration des rekombinant gereinigten BphO aus *P. aeruginosa* betrug 1  $\mu\text{M}$  in 250  $\mu\text{l}$  Pufferansatz. Die Ansätze wurden mit 1  $\mu\text{l}$  des BphO Serums bei 4°C für 60 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden wie unter 3.10.1.1 beschrieben verfahren.

### 3.10.1.3 Western-Blot

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern nachzuweisen, wurden diese gelelektrophoretisch getrennt und anschließend durch hydrophobe Wechselwirkungen auf die Membran transferiert. Dazu wurden die SDS-Gele mit aufgetrennten Proteinen 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde parallel für 5 min in Methanol aktiviert und dann ebenfalls in Blotpuffer getränkt. Der Proteintransfer erfolgte bei 15 V für 30 min. Nach Transferende wurde die Membran für den immunologischen Nachweis weiter behandelt.

Lösungen für den Proteintransfer:

Towbin-Puffer	Tris-HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
Blockierungslösung (10x TBS)	Tris-HCl, pH 7,3	100 mM
	NaCl	1,37 M
TBS-Puffer	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM

### 3.10.1.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der spezifische Nachweis, der auf der Membran immobilisierten Ziel-Proteine, erfolgte durch Anti-BphO-Antikörper. Um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Membran zu vermeiden, wurde diese zuvor eine Stunde mit Blockierungslösung bei RT abgesättigt und ü.N. bei 4°C mit dem Anti-BphO-Antikörper inkubiert (1:50.000-Verdünnung in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS), 10% BSA). Zur Entfernung der ungebundenen Antikörper wurde die Membran nachfolgend dreimal für 10 min in 1x PBS gewaschen und anschließend für 60 min bei RT mit dem sekundären Antikörper (Ziegen Anti-Kaninchen IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase, 1:20.000-Verdünnung in TBS, 10% BSA) inkubiert. Nach Entfernung des ungebundenen Sekundärantikörper durch erneutes Waschen in 1x TBS (3x 10 min) erfolgte die Nachweisreaktion.

### 3.10.1.5 Visualisierung mit Farbreaktion

Für die Visualisierung wurde die Membran in 20 ml Alkalische-Phosphatase-Puffer (AP-Puffer) einmal gewaschen und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde

die Membran in 20 ml (AP-Puffer) mit 132  $\mu$ l Nitroblau-Tetrazolium-Stammlösung (NBT) und 66  $\mu$ l 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Stammlösung (BCIP) inkubiert und die Entwicklung durch Waschen in 20 ml Stopplösung beendet.

Lösungen für die Visualisierung mit Farbreaktion:

AP-Puffer	Tris-HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NBT-Stammlösung	in 70 % (v/v) DMSO	50 $\mu$ g/ml
BCIP-Stammlösung	in DMSO	
	BCIP	5 % (v/v)
Stopplösung	in TBS	
	EDTA	2 mM

#### 3.10.1.6 Visualisierung mit Chemilumineszenzreaktion

Um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen, wurde die Membran mit einem Lumi-Phos<sup>TM</sup>WB-Substrat (Pierce) behandelt. Die nach der Zweit-Antikörperinkubation bereits mit dem Alkalische-Phosphatase-Puffer gewaschene Membran wurde zusätzlich zweimal für 5 min mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen und äquilibriert. Anschließend wurde die Membran für 3 min in dem Phos<sup>TM</sup>WB-Substrat inkubiert (0,125 ml/cm<sup>2</sup> für eine Membran). Das Substrat wurde sorgfältig entfernt und die Membran mittels Fluoreszenz (Geldoc) dokumentiert.

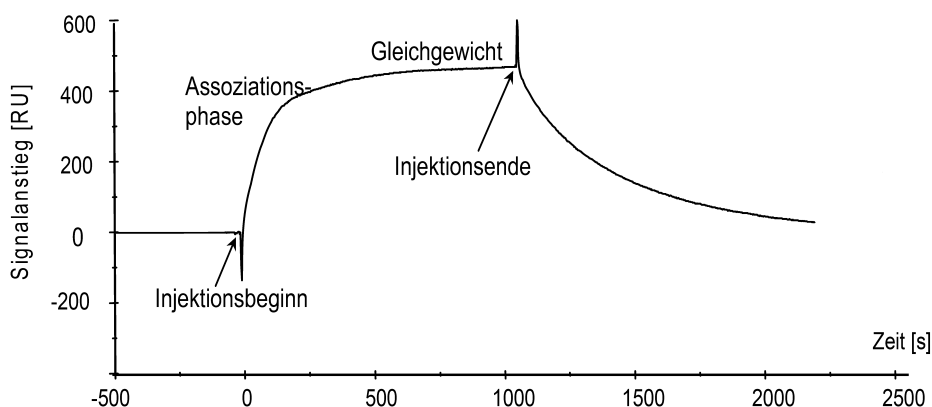
### 3.10.2 Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels Gelpermeationschromatographie

Eine weitere Methode zur Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion ist die Gelpermeationschromatographie (GPC), bei der Moleküle aufgrund ihrer Stokes-Radien getrennt werden. Um zwischen dem Protein-Komplex und unkomplexierten Proteinen unterscheiden zu können, wurde zunächst für beide Proteine das jeweilige Elutionsvolumen mit einer Superdex 200 HR 10/30 ermittelt. Anschließend wurden BphO und BphP in einem molaren Verhältnis von 1:1 30 min bei RT inkubiert und auf die Gelpermeationschromatographie aufgetragen.

### 3.10.3 Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels SPR

Die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Echtzeit, ohne dass dabei eine Markierung der Moleküle erfolgen muss (Fagerstam *et al.*, 1992; Silin und Plant, 1997). Eine der beiden interagierenden Komponenten wird auf der Sensoroberfläche eines Chips immobilisiert (Ligand) und die andere in einem konti-

nuierlichen Fluss über die Sensoroberfläche geleitet (Analyt). Das Prinzip beruht auf Veränderungen in der Massenkonzentration von Makromolekülen auf der Oberfläche des Sensorchips. Die eigentliche Messgröße ist dabei der Brechungsindex der Flüssigkeit direkt über dem Chip. Diese ändert sich proportional zur Dichte der Flüssigkeit. Der zeitliche Verlauf der Dichteveränderung kann durch das BIAcore-Gerät (BIAcore2000<sup>TM</sup>, Pharmacia) in Echtzeit verfolgt werden, wobei die Änderung des Brechungsindex in ein SPR-Signal (*response units*, RU) umgewandelt wird. Ein SPR-Signal von 1000 RU entspricht einer Oberflächenkonzentration von 1 ng/mm<sup>2</sup> und ist für eine bestimmte Massenänderung bei allen Proteinen und Peptiden gleich. Aufgetragen gegen die Zeit ergeben die RU das Sensorgramm. Da im Responsesignal auch unspezifische Bindung enthalten ist, muss diese abgezogen werden. Dafür wird die Differenz der Signale aus Flusszelle2 (Fc2) und Flusszelle1 (Fc1) gebildet und dieses so erhaltene Differenzsensorgramm zeigt die tatsächliche Bindung (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Schematisches Differenzsensorgramm einer Ligand-Analyt-Interaktion. Die einzelnen Phasen sind jeweils gekennzeichnet.

#### 3.10.3.1 Aminkopplung

Für die BphO-BphP-Studie wurde ein CM5-Chip (BIAcore) eingesetzt. Auf dem CM5-Chip befindet sich eine carboxymethylierte Dextranmatrix, auf die BphO chemisch durch Aminkopplung immobilisiert wurde. Die Aminkopplung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor der kovalenten Immobilisierung des BphO auf einen CM-5-Chip wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht, welcher Kopplungspuffer den optimalen pH-Wert besitzt, d.h. unter welchen Bedingungen sich aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen besonders viel Ligand an der Chipoberfläche anreichert. Dafür wurde der Ligand (BphO) in verschiedenen Kopplungspuffern verdünnt



und die Signalkurven am noch nicht mit dem Kopplungsreagenz aktivierten CM-5-Chip gemessen. Dabei wurde ein Puffer mit 100 mM Natriumazetat verwendet.

Für die Kopplung wurden die Carbomethylgruppen der Dextranbeschichtung des CM-5-Chips durch N-Ethyl-N-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) chemisch aktiviert und anschließend BphO gekoppelt. Für Interaktionsmessungen wurden ca. 1000 RU des Ligandens (BphO) immobilisiert, während die Konzentration des Analyten (BphP) zwischen 10  $\mu$ M und 1 mM variierte. Die Assoziation sowie die Dissoziation wurden über einen Zeitraum von 60 sek gemessen. Die Messung der Wechselwirkung von BphO mit BphP erfolgte im Hepes-Puffer bei einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min. Für die Auswertung wurden die Resonanzsignale in Resonanzeinheiten (RU) durch Subtraktion der Referenzzelle von unspezifischen Signalen korrigiert und alle Messungen auf eine Basislinie normalisiert.

#### 3.10.3.2 Streptavidin-Biotin-Kopplung

Für die BphO-BphP-Studie wurde ein SA-Chip (BIAcore) eingesetzt, der eine Streptavidin-Oberfläche besitzt. An die Chip-Oberfläche wurden ca. 500 RU N- und C-terminal biotinyliertes BphO immobilisiert. Die Konzentration des Analyten (BphP) variierte zwischen 10  $\mu$ M und 1 mM. Die Injektion des Analyten erfolgte mit einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min. Nach einer Assoziation von 60 sek folgte eine Dissoziation von 60 sek, wobei die Probenlösung durch den Hepes-Puffer verdrängt wurde. Anschließend erfolgte die Regeneration der Oberfläche durch Entfernung der gebundenen Proteine auf der Chip-Oberfläche durch drei Injektionen von 10  $\mu$ l 1 M NaCl, wodurch die anfängliche Basislinie wieder erreicht wurde.

#### 3.10.3.3 Auswertung der gemessenen BphO-BphP-Interaktion mittels SPR

Die Auswertung der Messung erfolgte durch das BIA-Evaluierungsprogramm in Form eines Sensorgramms, in welchem die Veränderung des Resonanzsignals in Resonanzeinheit (RU) gegen die Zeit aufgetragen wurde.

### 3.11 Kristallisationsversuche mit BphO aus *P. aeruginosa*

Bei der Kristallisation wird die Löslichkeit des jeweiligen Proteins kontrolliert herabgesetzt, so dass die Proteine in Form von Kristallen ausfallen. Um Proteine unter kontrollierten Bedingungen von einem gelösten in den kristallinen Zustand zu überführen, wurde das Prinzip der Dampfdiffusion eingesetzt. Dabei wird eine konzentrierte

Proteinlösung mit einer Reservoirlösung, die ein Fällungsmittel sowie Salze, organische Lösungsmitteln oder Polyethylenglykol enthält, zu einem Tropfen vermischt. Dieser Proteintropfen wird räumlich von der Reservoirlösung getrennt (Davies und Segal, 1971; Weber, 1977). Zur Kristallisation wurde die "Sitting-Drop"-Methode angewendet. Hierbei wird dem Protein im Tropfen über die Gasphase langsam Wasser entzogen, so dass es zu einer Übersättigung der Proteinlösung kommt. Das Reservoir wurde mit 150 µl Fällungsmittel enthaltender Puffer-Lösung befüllt. In die Vertiefung einer Kristallisationsschale wurden je 3 µl der konzentrierten, zentrifugierten Proteinlösung mit 3 µl Reservoirlösung vermischt. Die Kristallisationskammern wurden anschließend luftdicht verschlossen. Bei Kristallisationsexperimenten nach der Methode des hängenden Tropfens wurde die konzentrierte Proteinlösung auf einem zuvor silikonisierten Deckgläschen mit dem gleichen Volumen der Reservoirlösung vermischt. Das Deckgläschen mit dem Tropfen wurde umgedreht und über eine mit Reservoirlösung gefüllte Vertiefung gesetzt. Diese Kristallisationsschalen waren ebenfalls zuvor mit Silikonöl beschichtet worden, um einen Gasaustausch mit der Umgebung zu verhindern. Die verwendeten Proteinlösungen wurden gegen 25 mM Hepes-KOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin dialysiert und in Konzentrationen von 2,5; 3,5; 5; 7 und 10 mg/ml eingesetzt. Es wurden sowohl BphO:BV- als auch BphO:Häm-Komplexe für die Kristallisation eingesetzt. Die Kristallisationsansätze wurden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt und bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 17°C, 20°C) gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden die Ansätze unter dem Polarisationsmikroskop nach Proteinkristallen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Screening-Kits der Firmen Hampton Research (Laguna Hills, USA) verwendet.

Verwendete Kits:

Crystall Screens I

Crystall Screens II

Crystall Screen Cryo

Crystall Screen PEG

Crystall Screen Natrix

Grid Screen Ammonium Sulfate

the Anions

the Cations

the Classics

The Classics lite

the Pegs

the CMI

the CMII

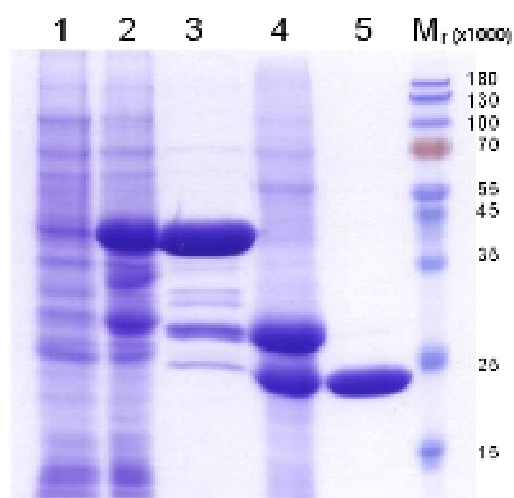
### **3.12 Bioinformatische Methoden**

Aminosäuresequenz-Alignments wurden mit dem Lasargene Software Paket v. 6 (DNASar, Madison, Wisconsin) bearbeitet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1.1 Rekombinante Produktion und Reinigung von BphO aus *P. aeruginosa*

Die Produktion von rekombinantem BphO erfolgte als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-tag. Zu Beginn dieser Arbeit lag das *bphO*-Gen bereits kloniert im Expressionsvektor pGEX-6P-1 vor. Dieser Vektor erzielt eine hohe Expression durch einen IPTG induzierbaren  $P_{tac}$ -Promotor. Die heterologe Produktion des GST-BphO-Fusionsproteins erfolgte in dem proteasedefizienten *E. coli*-Stamm BL21CodonPlus<sup>TM</sup> (DE3)-RIL. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Reinigung des BphO-Proteins erfolgte mit Hilfe der Affinitätschromatographie über das N-terminal fusionierte GST-tag mittels Glutathion-Sepharose<sup>TM</sup> 4B in zwei Schritten. Zur Kontrolle der Reinigung wurden nach verschiedenen Arbeitsschritten Proben entnommen, die im SDS-Gel aufgetrennt wurden (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Produktion und Reinigung des *P. aeruginosa* BphO-Proteins. Das 12,5%-ige Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-Gel zeigt das Gesamtzellextrakt von *E. coli*-Zellen vor Induktion mit IPTG (Spur 1), nach Induktion mit IPTG (Spur 2), GST-BphO nach der Glutathion-Sepharose-Affinität (Spur 3), das mit PreScission-Protease geschnittene GST-BphO (Spur 4), BphO nach der zweiten Glutathion-Sepharose-Affinität (Spur 5), Spur  $M_r$  zeigt den Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ( $\times 10^{-3}$ ) ist angegeben.

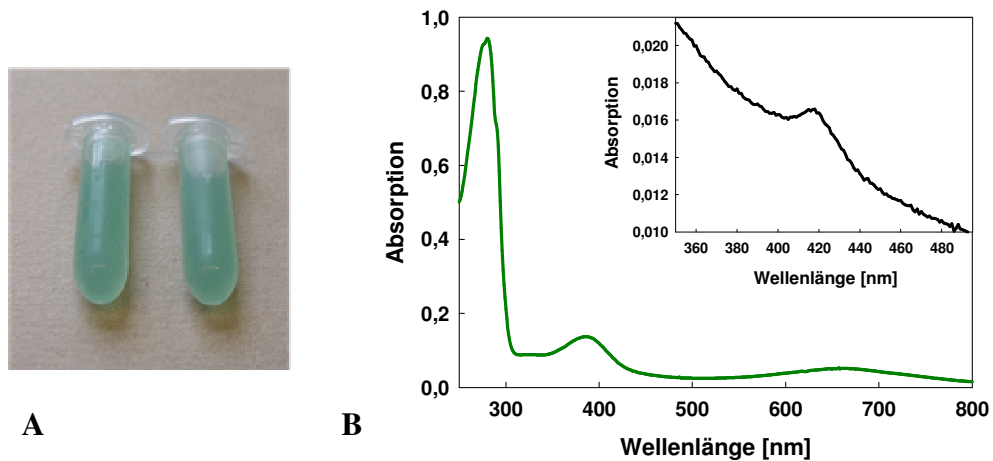
Spur 1 stellt den Gesamtzellextrakt von *E. coli*-Zellen vor und Spur 2 nach Induktion mit IPTG dar. Nach Induktion mit IPTG ist eine Bande bei ca. 45.000 im SDS-Gel zu erkennen, was auf eine heterologe Proteinexpression von GST-BphO-Fusionsprotein (48, 200) hinweist. Bei der Elution von GST-BphO mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer wurde das Fusionsprotein fast vollständig von der Säule eluiert (Abbildung 15, Spur 3). Die Spaltung des GST-BphO-Fusionsproteins wurde in einem PreScission Protease-Verdau-Puffer mit PreScission<sup>TM</sup> Protease vorgenommen (Abbildung 15, Spur 4). Es

wurde eine annähernd hundertprozentige Abspaltung erreicht. Zur Entfernung des GST-Anteils wurde eine zweite Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose<sup>TM</sup> 4B durchgeführt (Abbildung 15, Spur 5). Die im SDS-Gel beobachtete einzelne Bande bei ca. 22,000 stimmt mit der anhand der Aminosäurezusammensetzung berechneten Masse für BphO aus *P. aeruginosa* von 21,800 überein. Nach diesem Reinigungsprotokoll wurde das BphO-Protein bis zur 99%-igen Homogenität gereinigt und bis zu 10 mg BphO aus 1 l *E. coli*-Flüssigkultur gewonnen und für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

Die gleichen Expressionsbedingungen und das Reinigungsprotokoll galten auch für die Reinigung sämtlicher BphO Varianten. Abweichend vom Reinigungsprotokoll wurde dem zellfreien Extrakt der BphO-Varianten 5 mM DTT zugegeben, was die Bindung von GST-Molekülen an die Glutathion-Sepharose fördern soll.

Interessanterweise wies die *E. coli*-Kultur nach der Expression eine grüne Farbe auf. Dies bestätigte die Aktivität der BphO Hämoxygenase, die schon während der Proteinproduktion das Häm aus *E. coli* zu BV enzymatisch umsetzt. Dieses Phänomen wurde bereits für viele rekombinant produzierte HOs beschrieben (Suzuki *et al.*, 1992; Wilks und Ortiz de Montellano, 1993; Wilks und Schmitt, 1998). Ebenfalls auffällig war die deutliche Grünfärbung des gereinigten Proteins, was auf das Vorhandensein von gebundenem BV schließen lässt (Abbildung 16, A). Eine zusätzliche Bestätigung der Produktion von BV während der Proteinexpression konnte durch eine Proteinexpression und Reinigung unter anaeroben Bedingungen gewonnen werden. In diesem Fall wurde keine Grünfärbung beobachtet. Da die enzymatische Spaltung von Häm durch HOs ein sauerstoffabhängiger Prozess ist, sollte unter anaeroben Bedingungen keine BV-Produktion erfolgen.

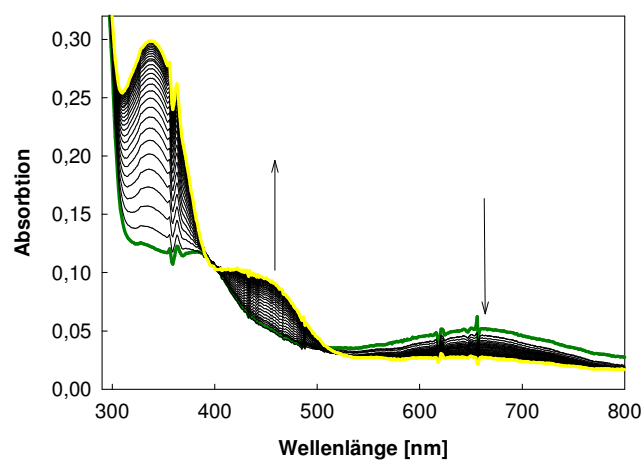
Das Absorptionsspektrum von aerob gereinigten BphO zeigt ein typisches BV-Spektrum mit zwei Maxima bei 380 und 650 nm (Abbildung 16, B). Das anaerob gereinigte BphO weist aber ein Absorptionsmaximum bei 420 nm auf, was auf die Bildung eines BphO:Häm-Komplexes hindeutet (Abbildung 16, B, Insert).



**Abbildung 16:** Spektroskopische Charakterisierung des BphO. **A:** Das unter aeroben Bedingungen gereinigte BphO hat eine Grünfärbung. **B:** Das unter aeroben (grün) und anaeroben (Insert) Bedingungen gereinigten BphO.

#### 4.1.2 Identifizierung der BphO-Reaktionsprodukte mittels Biliverdinreduktase-Test

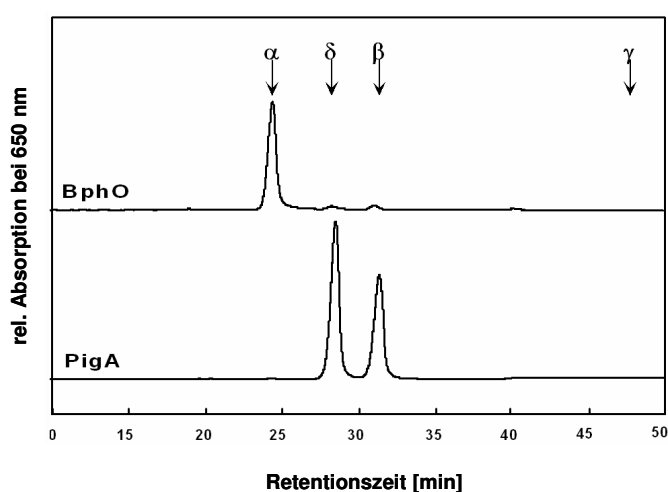
Um zu überprüfen, ob die Grünfärbung des gereinigten BphO auf die Bildung von BV IX $\alpha$  zurückzuführen ist, wurde ein Biliverdinreduktase-Test durchgeführt. Das Enzym BVR ist am Hämatabolismus in Säugern beteiligt und setzt BV IX $\alpha$  zu BR um. Abbildung 17 zeigt die Produktion des BR durch Zugabe von rekombinanter BVR aus Ratte und dem NADPH-regenerierenden System zu dem BphO:BV-Komplex. Die enzymatische Umwandlung von dem an BphO gebundenen BV wurde spektroskopisch verfolgt und resultierte im Abbau des BV mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm (grün) und der Bildung von BR mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm (gelb).



**Abbildung 17:** Spektraler Verlauf der Umsetzung des BphO:BV-Komplexes zu Bilirubin. Zu dem gereinigten BphO:BV-Komplex wurde 5  $\mu$ g der rekombinanten BVR aus Ratte (zellfreier Extrakt einer Expressionskultur) zugegeben und die Reaktion mit dem NADPH-regenerierenden System gestartet. BV (grün) wurde zu BR (gelb) umgesetzt.

### 4.1.3 Identifizierung der BphO- und PigA-Reaktionsprodukte mittels HPLC

Um herauszufinden, welche BV-Isomere in BphO und PigA katalysierten Reaktionen gebildet werden, wurden die Reaktionsprodukte mittels HPLC analysiert. Die Bildung des BVs durch die enzymatische Häumsetzung mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator wurde durch einen Farbumschlag von rot-braun nach grün beobachtet. Die Reaktionsprodukte wurden über C<sub>18</sub> SepPak-Säulen aufgereinigt und anschließend über HPLC analysiert (Abbildung 18). BV IX $\alpha$  ist das Produkt der BphO-Reaktion, während BV IX $\beta$  und BV IX $\delta$  die Produkte der PigA-Reaktion sind. Als Standard dienten die vier Biliverdinisomere, die durch gekoppelte Oxidation gewonnen wurden (Tasler, 2006).



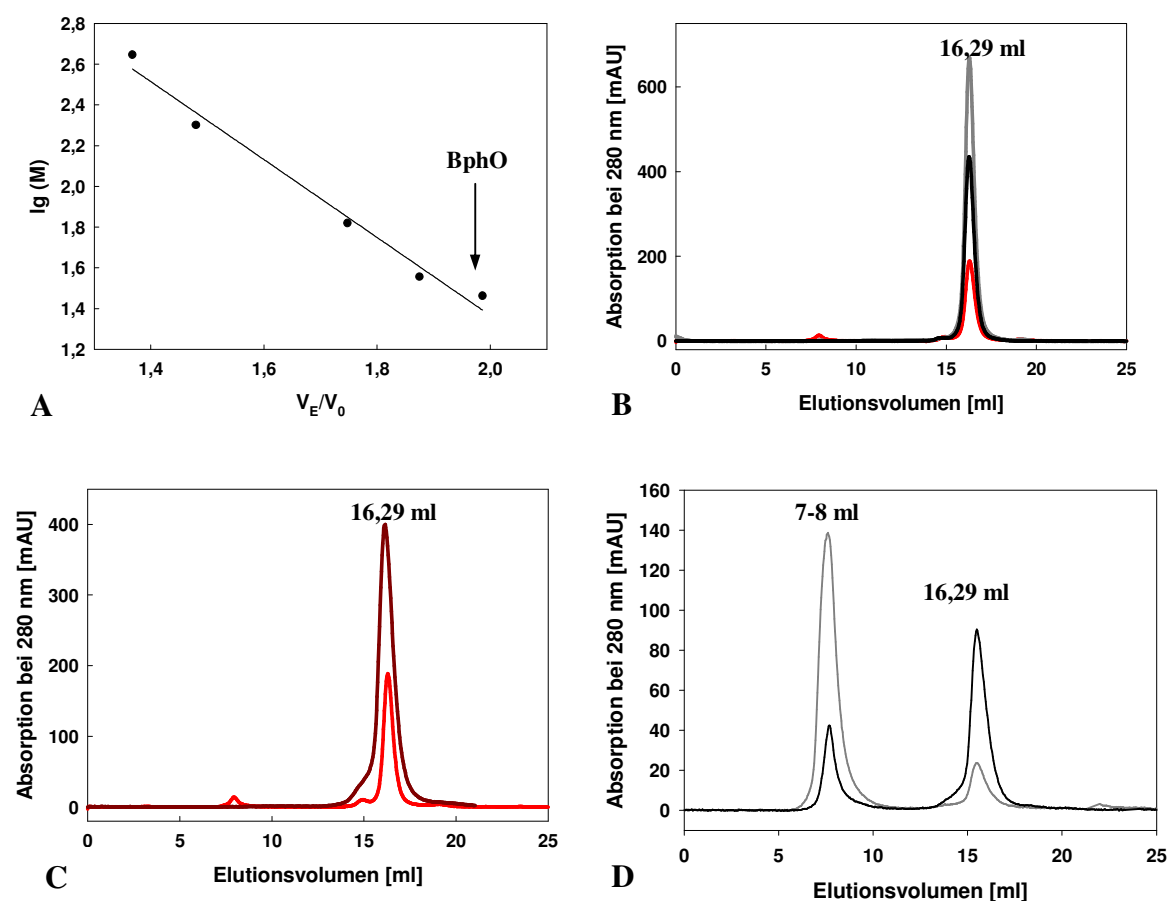
**Abbildung 18:** HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte von BphO und PigA aus *P. aeruginosa*. Die Produkte der Hämoxygenase-Reaktion wurden über SepPak-Säulen aufgereinigt, eingetrocknet und über HPLC analysiert. Die Elution der Biliverdinisomere wurde bei 650 nm verfolgt.

## 4.2 Analytische Gelpermeationschromatographie

Die analytische Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, in An- und Abwesenheit eines Reduktionsmittels durchgeführt. Unter allen Bedingungen eluierte BphO als symmetrischer Peak mit einem Elutionsvolumen von 16,29 ml (Abbildung 19, B). Durch Vergleich der Elutionsvolumina von Proteinen mit bekannter molekularer Masse (Abbildung 19, A) konnte die relative molekulare Masse von BphO ermittelt werden. BphO liegt mit einer molekularen Masse von ca. 23.000 als Monomer vor. Der BphO: Häm-Komplex wurde ebenfalls einer analytischen GPC unterzogen und lieferte ein identisches Ergebnis (Abbildung 19, C). Bis jetzt wurde nur für die Hämoxygenase, HO-2, aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 ein Homodimer des Häm:HO-Komplexes beschrieben (Sugishima *et al.*, 2005).

Interessanterweise liegt der HO-2:Häm-Komplex als Homodimer vor, während HO-2:BV-Komplex ein Monomer bildet.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass das gereinigte Enzym durch die Aufbewahrung bei 4°C nach 3-7 Tagen teilweise ausfällt. Durch die Untersuchung der verbliebenen Überstände mittels GPC konnte gezeigt werden, dass eine erneute Aggregatbildung stattgefunden hatte. Aggregate eluierten als ein ungewöhnlicher symmetrischer Peak mit einem Elutionsvolumen von 7-8 ml, entsprechend relativer molekularer Masse von 250.000 – 200.000 (Abbildung 19, D). Da die Gewährleistung der Homogenität einer Proteinklösung ein kritischer Faktor ist, war es von großer Bedeutung, entsprechende Pufferbedingungen für das BphO zu finden, bei dem das Protein in homogener Form vorliegt. Folgende Pufferbedingungen haben sich als optimal erwiesen: 25 mM Hepes-KOH, 100 mM KCl, pH 7,5.



**Abbildung 19:** Elutionsdiagramm der präparativen GPC der *P. aeruginosa* BphO an der Superdex 200 HR 10/30 Säule. **A:** Eichgerade (Superdex 200 HR 10/30 Säule) mit folgenden Molekulargewichts-Standards: Apoferritin 443,000;  $\beta$ -Amylase 200,000; Alkoholdehydrogenase 150,000; Ovalbumin 45,000; Carboanhydrase 29,000. Aufgetragen wurde der Logarithmus der  $M_r$  gegen den Quotienten aus Elutionsvolumen der einzelnen Markerproteine und  $V_0$  (= 8 ml). **B, C:** Das in Anwesenheit von Reduktionsmittel gereinigte BphO:BV-Protein (B, grau), das in Abwesenheit von Reduktionsmittel

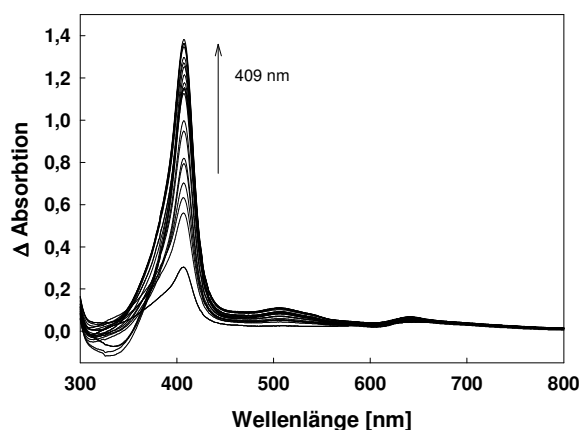


gereinigtes BphO:BV-Protein (B, schwarz) und der BphO:Häm-Komplex (C, braun) eluierten als symmetrischer Peak. Zum Vergleich ist die Elution einer Carboanhydrase-Lösung gezeigt (B und C, rot). Die relative molekulare Masse der Carboanhydrase ist 29,000, und stimmt somit mit der erwarteten relativen molekularen Masse des monomeren BphO und des BphO:Häm-Komplexes überein. Alle Experimente wurden in 25 mM Hepes-KOH, 100 mM KCl, pH 7,5 (1 mM DTT) durchgeführt. **D:** Analyse von aggregierter BphO durch GPC an Superdex 200 HR 10/30. Es wurden eine drei Tage alte (schwarz) und eine zehn Tage alte (grau) Proteinlösungen analysiert. Das aggregierte Protein eluierte bei 7,62 ml, entsprechend dem Ausschlussvolumen der Säule und einer relativen molekularen Masse größer als 200,000. Das native Protein eluierte als symmetrischer Peak bei 16,29 ml.

## 4.3 Katalytische Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes

### 4.3.1 Hämbindungsstudien

Eine der Charakteristiken von HOs ist die Eigenschaft, Häm zu binden und einen stabilen Häm:HO-Komplex zu bilden (Yoshida und Kikuchi, 1978). Durch Zugabe von Häm zu gereinigtem BphO:BV-Komplex, wird das an BphO gebundene BV verdrängt, was durch eine Farbänderung von grün zu rot-bräunlich beobachtet werden konnte. Anschließend wurde anhand der Differenzspektroskopie ein Maximum für den BphO:Häm-Komplex bei 409 nm (Soretbande) identifiziert (Abbildung 20).



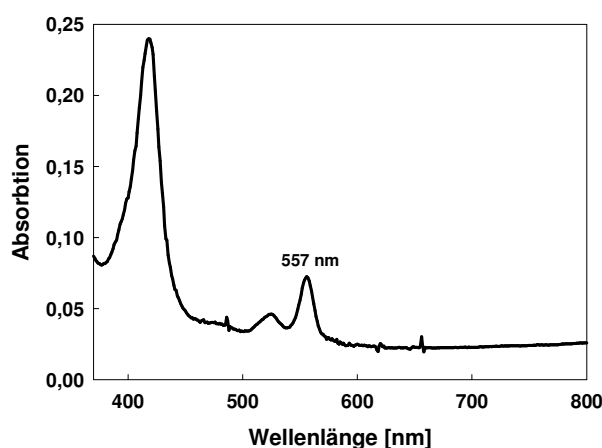
**Abbildung 20:** Differenzspektren der Titration des Häms zu BphO. Eine 1 mM Hämlösung wurde schrittweise (1-30  $\mu$ M) zu 10  $\mu$ M BphO und in eine Referenzküvette titriert. Das Spektrum wurde zwischen 300 und 800 nm aufgenommen. Das Absorptionsmaximum für den BphO:Häm-Komplex liegt bei 409 nm.

Das Absorptionsspektrum des BphO:Häm-Komplexes unterscheidet sich von den Absorptionsspektren des BphO:BV-Komplexes und des freien Häms und ähnelt den in der Literatur beschriebenen Maxima für bakterielle HO:Häm-Komplexe (Takahashi *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000; Muramoto *et al.*, 2002; Migita *et al.*, 2003). Alle Versuche, eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) für den BphO:Häm-Komplex zu ermitteln,

erbrachten keine reproduzierbaren Daten. Grund dafür ist vermutlich, dass BV- und Häm-Moleküle um Bindungsplätze an BphO konkurrieren.

#### 4.3.2 Ermittlung des Extinktionskoeffizienten

Der millimolare Extinktionskoeffizient für den BphO:Häm-Komplex wurde bei 557 nm (Abbildung 21) mittels der Pyridin-Hämochrom-Methode ermittelt (Berry *et al.*, 1987; Wilks, 2002). Der Extinktionskoeffizient betrug  $97,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und ist der bisher kleinste ermittelte Extinktionskoeffizient für bakterielle HOs (Tabelle 9).



**Abbildung 21:** Spektrometrische Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für BphO. Das Spektrum zeigt die reduzierte Form des BphO Proteins. Details der Extraktion sind unter 3.7.4.2 (Material und Methoden) angegeben.

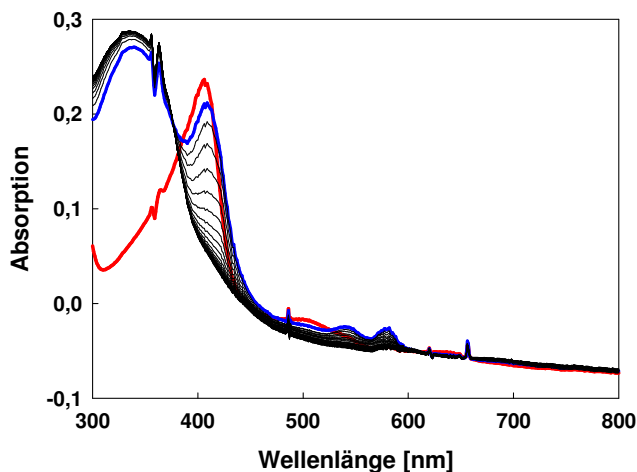
**Tabelle 9:** Extinktionskoeffizienten von unterschiedlichen HOs.

Enzym	Organismus	Extinktionskoeffizient [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]
HO-1	<i>H. sapiens</i>	140
HmuO	<i>C. diphtheriae</i>	121
HemO	<i>N. meningitidis</i>	179
PigA	<i>P. aeruginosa</i>	129
BphO	<i>P. aeruginosa</i>	97,6

#### 4.3.3 Untersuchungen zu Redoxpartnern der *P. aeruginosa* BphO

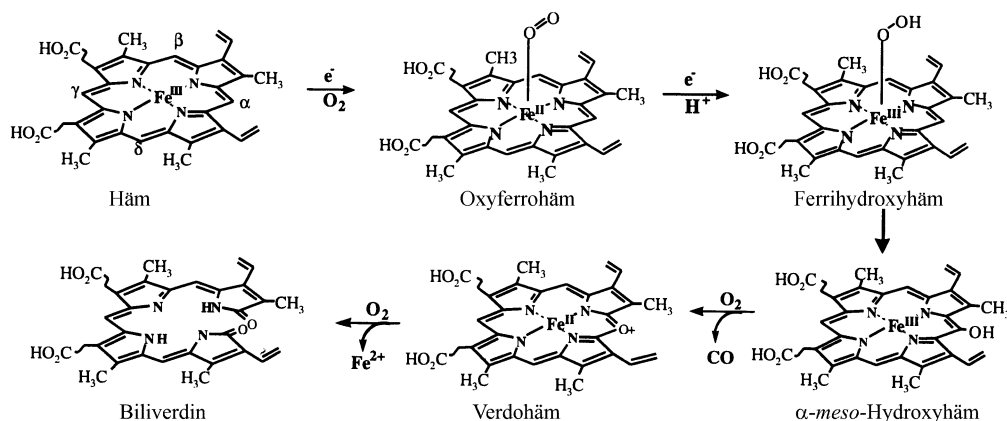
Für die Katalyse der Hämoxygenasereaktion ist ein externer Elektronendonator notwendig. Während HOs aus Säuger NADPH Cytochrom P450 Reduktase als Elektronenquelle benutzen (Yoshida und Kikuchi, 1978), wurde reduziertes Ferredoxin als Elektronenlieferant für cyanobakterielle und HOs aus Algen *in vitro* beschrieben (Rhie und Beale, 1992; Cornejo *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Elektronendonatoren für BphO aus *P. aeruginosa* getestet. Die Untersuchung der BphO Aktivität erfolgte unter Verwendung des gekoppelten Enzymtests

(Kapitel 3.7.5), welches standardmäßig Ferredoxin (Spinat) als Redoxpartner enthält. In Anwesenheit von reduziertem Ferredoxin (Spinat) wurde der BphO:Häm-Komplex [BphO:Häm( $\text{Fe}^{3+}$ )] sofort zum Oxyferro-Komplex [BphO:Häm( $\text{Fe}^{2+}$ )- $\text{O}_2$ ] umgewandelt. Dieser konnte durch eine Verschiebung der Soretbande von 409 zu 412 nm und durch Erscheinen von  $\beta/\alpha$ -Banden bei 545 und 579 nm nachgewiesen werden (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes. Der BphO:Häm-Komplex (rot) wurde in Anwesenheit von reduziertem Ferredoxin über Oxyferro-Komplex (blau) zu  $\text{Fe}^{3+}$ -BV umgesetzt.

Innerhalb von 30 min wurde der Oxyferro-Komplex [BphO( $\text{Fe}^{2+}$ )- $\text{O}_2$ ] vollständig zu Ferri-BV [BphO( $\text{Fe}^{3+}$ )-BV] umgewandelt (Abbildung 22). Eine schematische Darstellung der Oxidation des Häms zu BV ist in Abbildung 23 dargestellt.

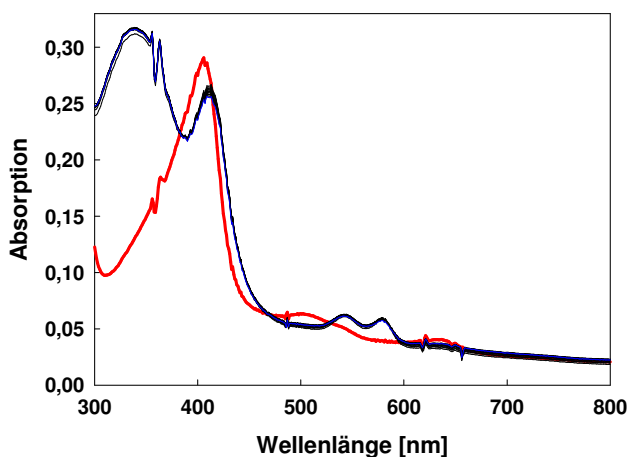


**Abbildung 23:** Schematische Darstellung der Oxidation des Häms zu Biliverdin.

Die Produktion des Oxyferro-Komplexes als Zwischenproduktes wurde auch für andere HOs beschrieben (Yoshida und Kikuchi, 1978; Wilks und Ortiz de Montellano, 1993;

Wilks und Schmitt, 1998).

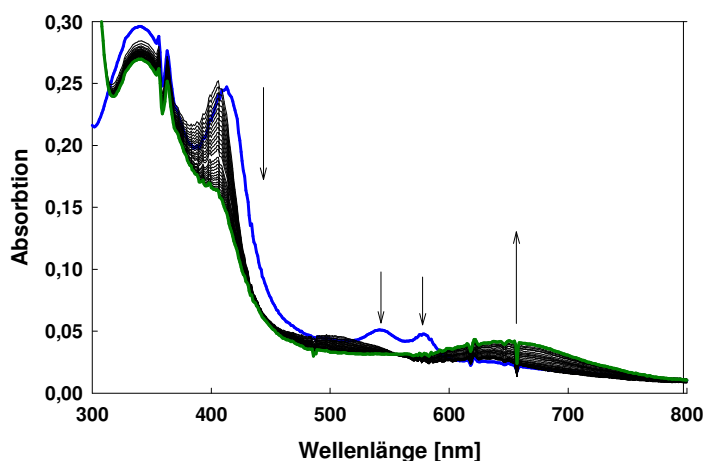
Um auszuschließen, dass die beobachtete Reaktion durch entstandene Hydroperoxidradikale chemisch und nicht enzymatisch abgelaufen ist, wurde dem Versuchsansatz Katalase zugefügt. Ferredoxine haben ein genügend negatives Redoxpotential, um  $O_2$  zu Superoxidanionen zu reduzieren (Arora *et al.*, 2002). Die Protonierung des Superoxidanions führt zu Bildung eines Hydroperoxidradikals, das spontan mit einem anderen Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reagiert. Es ist bekannt, dass Wasserstoffperoxid spontan  $Fe^{2+}$ -Häm hydroxyliert (Avila *et al.*, 2003). Durch Zugabe von Katalase wird Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff umgesetzt. Interessanterweise verläuft die Reaktion nach Zugabe von Katalase langsamer und nur bis zum Oxyferro-Komplex  $[BphO(Fe^{2+})-O_2]$  (Abbildung 24). Dies deutet darauf hin, dass die Umwandlung vom Oxyferro-Komplex  $[BphO(Fe^{2+})-O_2]$  zu Ferri-BV  $[BphO(Fe^{3+})-BV]$  in Anwesenheit von Ferredoxin über entstandene Hydroperoxidradikale verläuft, also chemischer und nicht enzymatischer Natur ist.



**Abbildung 24:** Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes. Der BphO:Häm-Komplex (rot) wurde in Anwesenheit von reduziertem Ferredoxin und Katalase nur bis zum Oxyferro-Komplex (blau) umgesetzt.

HOs aus Algen (Rhie und Beal, 1992) und aus Cyanobakterien können unter *in vitro* Bedingungen Ferredoxin als Elektronendonator nutzen. Die Umsetzung des HO:Häm-Komplexes aus Cyanobakterien läuft nur bis zum stabilen Oxyferro-Komplex  $[HO:Häm(Fe^{2+})-O_2]$  (Cornejo *et al.*, 1998; Migita *et al.*, 2003). Dies weist auf die Notwendigkeit eines zweiten Reduktionsmittels in dem katalytischen Zyklus der HOs aus Cyanobakterien hin (Cornejo *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde die katalytische Umsetzung des Häms durch BphO in Anwesenheit von zwei Reduktionsmitteln getestet.

Die Umsetzung erfolgte in zwei Schritten. Beim ersten wurde der BphO:Häm-Komplex in Anwesenheit von Katalase nach Zugabe von reduziertem Ferredoxin in einen Oxyferro-Komplex umgewandelt (Abbildung 24). Im zweiten Schritt wurde dem Oxyferro-Komplex [BphO:Häm(Fe<sup>2+</sup>)-O<sub>2</sub>] ein zweites Reduktionsmittel zugegeben (Ascorbinsäure oder Trolox). Erst nach Zugabe von Ascorbinsäure wurde Oxyferro-Komplex vollständig zu Eisen-freiem BV umgewandelt (im Gegensatz zu Trolox), was an der Grünfärbung des Reaktionsansatzes und einer Zunahme des Peaks bei 650 nm deutlich wird (Abbildung 25). Dies bestätigt die enzymatische Umsetzung des Häms zu freiem BV, die von BphO aus *P. aeruginosa* katalysiert wird. *In vitro* verläuft die Katalyse in zwei Schritten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass unter physiologischen Bedingungen die Umsetzung des Häms zu BV in *P. aeruginosa* in einem Zyklus verläuft.



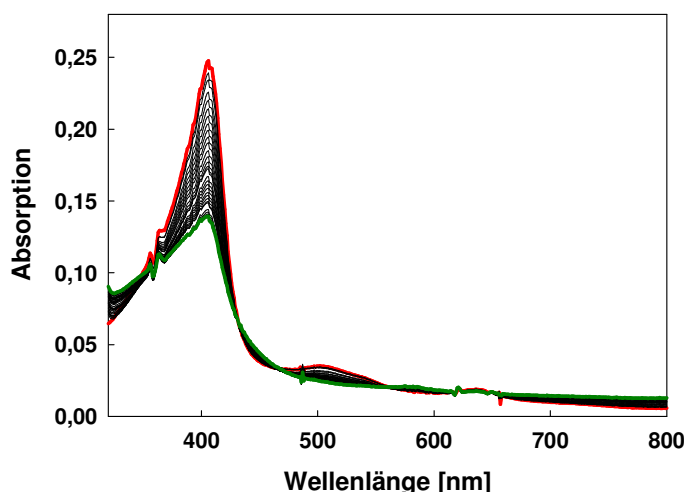
**Abbildung 25:** Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes. Der BphO:Häm-Komplex wurde in Anwesenheit von reduziertem Ferredoxin und Katalase bis zu Oxyferro-Komplex (blau) umgesetzt. Nach Zugabe von Ascorbinsäure zum Reaktionsansatz konnte der Oxyferro-Komplex (blau) zu freiem Biliverdin umgesetzt werden (grün).

#### 4.3.4 Auswirkung von unterschiedlichen Elektronendonatoren auf den Verlauf der Hämoxygenase-Reaktion

Die meisten HOs sind in der Lage, während der Proteinexpression endogene Elektronendonatoren aus *E. coli* zu verwenden, was in einer Grünfärbung der *E. coli*-Zellen resultiert (Wilks und Schmitt, 1998; Migita *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse liefern den Beweis, dass die HOs in der Lage sind, Reduktionssysteme von *E. coli* als Elektronendonatoren zu benutzen. Diese endogenen Elektronendonatoren haben genug Reduktionspotenzial, damit HOs das Häm aus *E. coli* enzymatisch zu BV umzusetzen. Dies konnte für BphO durch den BVR-Test bewiesen werden.

*E. coli*-Zellen besitzen eine Reihe für HOs in Frage kommende Reduktionspartner. Beispiele sind ein für Flavorubredoxin kodierendes Gen und zwei für Flavodoxin kodierende Gene. Deswegen wurden anstelle des reduzierten Ferredoxin aus *Spinacea* unterschiedliche Ferredoxine und Flavodoxin für die Untersuchung der BphO Aktivität zum Ansatz nach Standardbedingungen getestet. *Clostridium sp.* Ferredoxin [4Fe-4S] und *Porphyra sp.* Ferredoxin [2Fe-2S] wurden zusammen mit Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase aus Spinat nach den Standardbedingungen als mögliche Elektronendonatoren für BphO untersucht. Alle getesteten Ferredoxine waren in der Lage, BphO:Häm-Komplex bis zu Eisen-BV [BphO(Fe<sup>3+</sup>)-BV] zu reduzieren. Nur in Anwesenheit eines zweiten Reduktionsmittels, wie z.B. Ascorbinsäure, wurde die vollständige Bildung des eisenfreien BV festgestellt. In der von Flavodoxin vermittelten Reaktion wurde keine BV Bildung beobachtet.

Interessanterweise wurde in Anwesenheit von Ascorbinsäure als Reduktionmittel die Oxidation des BphO-Häms nur bis Eisen-BV [BphO(Fe<sup>3+</sup>)-BV] beobachtet (Abbildung 26). Die Zugabe von Katalase zu dem von Ascorbinsäure vermittelten Ansatz hatte keine Wirkung auf die Bildung des Endproduktes. Die Studien der bakteriellen HOs zeigen, dass diese, ähnlich wie HO-1 der Säuger, bei der von Ascorbinsäure vermittelten Reaktion Eisen-BV [HO(Fe<sup>3+</sup>)-BV] als Endprodukt haben. Eine Ausnahme stellt HO-1 aus *Synechocystis sp.* dar, deren Endprodukt in der von Ascorbinsäure vermittelten Reaktion freies BV ist (Migita *et al.*, 2003).



**Abbildung 26:** Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes. Der BphO:Häm-Komplex (rot) wurde in Anwesenheit von 5 mM Ascorbinsäure zu Eisen-BV (grün) umgesetzt.

Die Ergebnisse der *in vitro* getesteten Elektronendonatoren für BphO sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

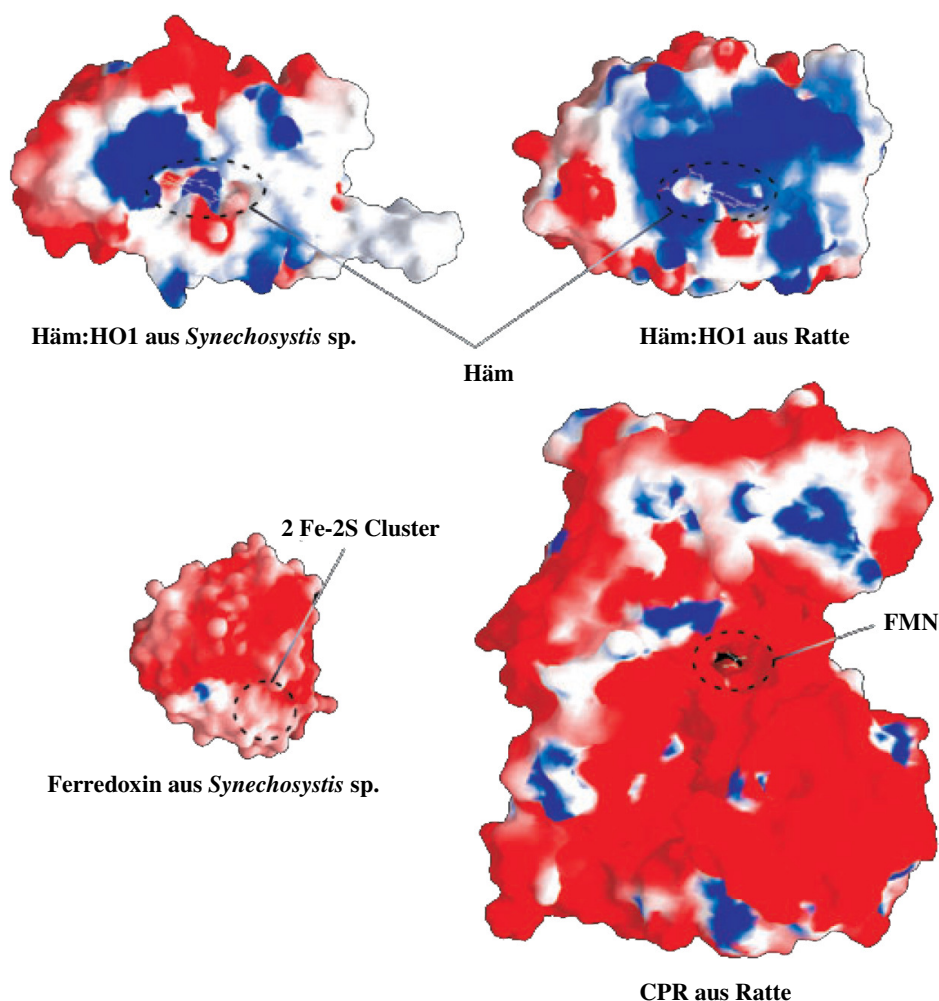
**Tabelle 10:** Die in den Reaktionsansätzen getesteten Reduktionsmittel.

Reduktionsmittel	Konzentration	Sichtbare Zwischenschritte	Endprodukt
Ferredoxin <i>Spinach</i> [2Fe-2S]	4,6 µM	Oxyferro-Komplex 412, 545, 579 nm Reduktion	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin
Ferredoxin <i>Clostridium</i> [4Fe-4S]	4,6 µM	Oxyferro-Komplex 412, 545, 579 nm Reduktion	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin
Ferredoxin <i>Porphyra</i> [2Fe-2S]	4,6 µM	Oxyferro-Komplex 412, 545, 579 nm Reduktion	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin
Ascorbinsäure	5 mM 10 mM 15 mM	BphO:Häm-Komplex (405 nm), Reduktion keine Reaktion keine Reaktion	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin
Trolox	5 mM	keine Reaktion	
Ferredoxin <i>Spinach</i> Ascorbinsäure (gleichzeitig)	4,6 µM 5 mM	Reduktion des BphO:Häm-Komplexes	Biliverdin
Ferredoxin <i>Spinach</i> Ascorbinsäure (später)	4,6 µM 5 mM	Biliverdin	Biliverdin
Ferredoxin <i>Clostridium</i> Ascorbinsäure (später)	4,6 µM 5 mM	Biliverdin	Biliverdin
Ferredoxin <i>Porphyra</i> Ascorbinsäure (später)	4,6 µM 5 mM	Biliverdin	Biliverdin
Ferredoxin <i>Spinach</i> Trolox (später)	4,6 µM 5 mM	Biliverdin	Biliverdin
Ferredoxin <i>Spinach</i> Katalase	4,6 µM 5 µM	Oxyferro-Komplex 412, 545, 579 nm; stabil	Biliverdin
Ascorbinsäure (später)		Biliverdin 680 nm	Biliverdin
Flavodoxin	53,3 µM	keine Reaktion	
Cytochrom P 450 Reductase	2,5 µM	keine Reaktion	

Für eine HO, HY1, aus *Arabidopsis thaliana* wurde die Freisetzung des Eisens aus Eisen-BV [HO(Fe<sup>3+</sup>)-BV] in Anwesenheit von Eisenchelatoren beschrieben (Muramoto *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurden potenzielle Eisenchelatoren getestet, die zur Freisetzung des Eisens aus dem Eisen-BV-Komplex [BphO(Fe<sup>3+</sup>)-BV] beitragen sollten. Die getesteten Eisenchelatoren Desferrioxamin, Tiron und o-Phenanthrolin hatten keinen Einfluss auf die Freisetzung von Eisen (Daten nicht gezeigt).

Bei HOs aus Säugern erfolgt der Elektronentransfer mittels NADPH abhängiger Cytochrom P450 Reduktase (CPR) (Schacter *et al.*, 1972; Yoshida und Kikuchi, 1978; Yoshida *et al.*, 1980). HmuO aus *C. diphtheriae*, HemO aus *N. meningitidis* und PigA aus *P. aeruginosa* zeigen katalytische Aktivität mit CPR. In allen Fällen ist Eisen-BV das Endprodukt der enzymatischen Reaktion. Aus diesem Grund wurde humane CPR als Elektronendonator für die katalytische Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde kein Abbau des BphO:Häm-Komplexes festgestellt. Im Gegensatz zu den HOs aus pathogenen Bakterien wurde für die cyanobakterielle HO-1 aus *Synechocystis sp.* eine Umsetzung des HO:Häm-Komplexes in Anwesenheit von CPR bis zum stabilen Oxyferro-Komplex  $[\text{HO:Häm}(\text{Fe}^{2+})\text{-O}_2]$  beschrieben. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass CPR kein natürliches Reduktionsmittel für HO-1 aus *Synechocystis sp.* ist (Migita *et al.*, 2003). Diese Beobachtung stimmt mit Strukturdaten der HO-1 aus *Synechocystis sp.* überein, die einen Oberflächenvergleich zwischen HO-1 aus *Synechocystis sp.*, HO-1 aus Ratte, CPR aus Ratte und Ferredoxin aus *Synechocystis sp.* ermöglichen (Sugishima *et al.*, 2004). HO-1 aus *Synechocystis sp.* Zeigt im Vergleich zu HO-1 aus Ratte schmalere Bereiche, die mit polaren, positiv geladenen Aminosäuren besetzt sind (Abbildung 27). Durch eine große neutrale Oberfläche der Hämbindungs-tasche von HO-1 aus *Synechocystis sp.* könnte eine Bindung mit Ferredoxin schneller als mit CPR stattfinden (Sugishima *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse weisen auf Ähnlichkeiten im Verhalten von HO-1 aus *Synechocystis sp.* und BphO aus *P. aeruginosa* mit CPR als Reduktionsmittel hin und lassen vermuten, dass CPR kein natürlicher Reduktionspartner für BphO ist.

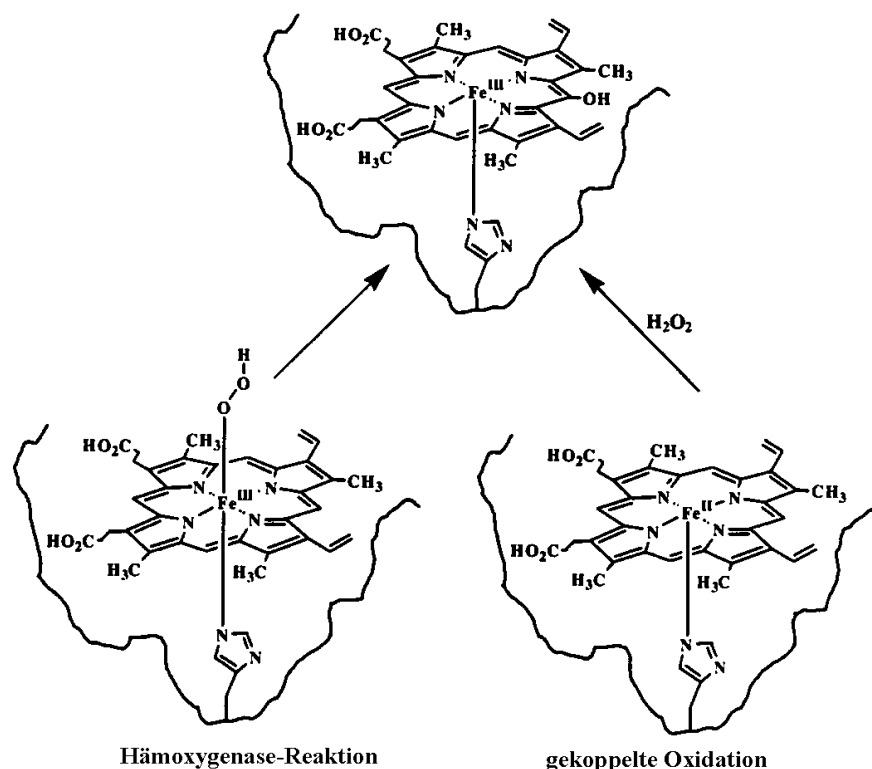




**Abbildung 27:** Molekulare Interaktion zwischen HO-1 und Ferredoxin aus *Synechosystis* sp.. Positiv geladene Aminosäuren sind in blau, und negativ geladene Aminosäuren in rot dargestellt.

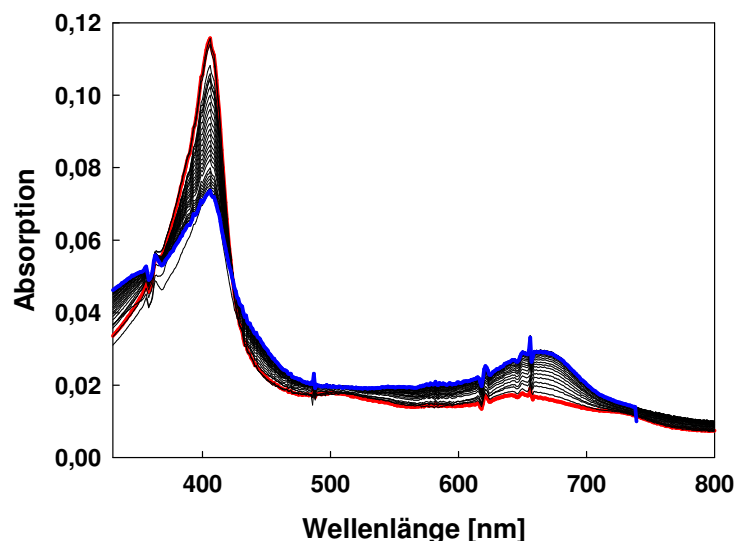
#### 4.3.5 Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes in Anwesenheit von $\text{H}_2\text{O}_2$

Hämoproteine oder Eisenporphyrine reagieren mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter geeigneten Bedingungen zu *meso*-Hydroxyhämproteinen und Verdohämen (Bonett *et al.*, 1973; Sano *et al.*, 1986; Avila *et al.*, 2003). Sowohl bei der enzymatischen Umsetzung des Häms mittels HOs als auch bei gekoppelter Oxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  findet die Hydroxylierung des Hämmoleküls an der  $\alpha$ -*meso*-Kohlenstoffbrücke unter Bildung des Zwischenproduktes  $\alpha$ -*meso*-Hydroxyhäm statt. Das  $\alpha$ -*meso*-Hydroxyhäm wird in Anwesenheit von Sauerstoff schnell zu Verdohäm umgesetzt. Verdohäme haben Absorptionsmaxima im spektralen Bereich zwischen 640 und 680 nm. Die Mechanismen der beiden Umsetzungen unterscheiden sich voneinander und sind in Abbildung 28 dargestellt.



**Abbildung 28:** Schematisches Modell für die Mechanismen der Umsetzung von Häm. Bei der Hämoxigenase-Reaktion wird der koordinierte Sauerstoff in Ferrohäm-Komplex zu einem Peroxo-Komplex reduziert, der seinerseits zu  $\alpha$ -meso-Hydroxyhäm oxidiert wird. Bei der gekoppelten Oxidation reagieren unkoordinierte Hydroperoxidradikale mit Ferrohäm-Komplex mit den Bildung von  $\alpha$ -meso-Hydroxyhäm.

Bei der von HO $\cdot$ s vermittelten Reaktion wird der koordinierte Sauerstoff in dem Ferrohäm-Komplex [HO:Häm(Fe $^{2+}$ )-O $_2$ ] zu einem Peroxo-Komplex [HO:Häm(Fe $^{3+}$ )-OOH] reduziert, der seinerseits zu  $\alpha$ -meso-Hydroxyhäm oxidiert wird. Bei der gekoppelten Oxidation mit H $_2$ O $_2$  reagieren unkoordinierte Hydroperoxidradikale mit dem Ferrohäm-Komplex [HO:Häm(Fe $^{2+}$ )] mit der Bildung von  $\alpha$ -meso-Hydroxyhäm, das in Anwesenheit von Sauerstoff sofort zu Verdohäm umgewandelt wird (Wilks und Ortiz de Montellano, 1993; Rivera und Zeng, 2005). Um die spektralen Änderungen der Spaltung des Häms im BphO:Häm-Komplex mittels gekoppelter Oxidation zu testen, wurde der BphO:Häm-Komplex mit H $_2$ O $_2$  inkubiert. Die Reaktion wurde über von 30 min spektrometrisch verfolgt. Die Umsetzung des Häms in dem BphO:Häm-Komplex mittels gekoppelter Oxidation war konzentrationsabhängig und erfolgte nur nach Zugabe von 300  $\mu$ M H $_2$ O $_2$ . Der Abbau des BphO:Häm-Komplexes resultierte in der Abnahme des Peaks bei 409 nm und der Zunahme des Peaks bei 650 nm (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Spektroskopische Charakterisierung der Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes. Der BphO:Häm-Komplex (rot) wurde in Anwesenheit von Hydroperoxyradikalen zu Verdohäm (blau) umgesetzt.

Das resultierende Spektrum ist typisch für Ferro-Verdohäm (Liu und Ortiz de Montellano, 2000). Wenn zu dem gleichen Ansatz 5  $\mu\text{M}$  Katalase zugegeben wurde, fand kein Hämabbau statt (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt, dass Häm im BphO:Häm-Komplex mittels Hydroperoxyradikalen über die gekoppelte Oxidation abgebaut wurde. *P. aeruginosa* BphP wurde mit dem Produkt der gekoppelten Oxidation inkubiert und anschließend ein Differenzspektrum aufgenommen. Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass aus Verdohäm in Anwesenheit von Sauerstoff ein lineares Tetrapyrrol gebildet wurde, das von BphP als Chromophor akzeptiert wird. Anhand der Spektren konnte jedoch nicht geklärt werden, ob Eisen-BV oder freies BV das Endprodukt dieser Reaktion ist. Frühere Studien zeigten, dass die Umsetzung von Häm:HO-Komplexen mittels gekoppelter Oxidation nur bis zu Verdohäm erfolgt und keine weiteren HO-katalysierten Umsetzungen des Verdohäms stattfinden (Wilks und Ortiz de Montellano, 1993; Ortiz de Montellano, 1998). Matsui *et al.*, 2005 postulierten einen Umsetzungsmechanismus des mit HO komplexierten Verdohäms zu BV mittels  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Umsetzung mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  verläuft ungefähr 40-mal schneller als die Umsetzung mittels  $\text{O}_2$ . Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die über die  $\text{H}_2\text{O}_2$  vermittelte Reaktion des BphO:Häm-Komplexes zunächst zu Verdohäm und anschließend zu BV führt.

#### 4.4 Mutagenesestudien zur Identifizierung des proximalen Eisen-Liganden bei BphO aus *P. aeruginosa*

Der erste Schritt im Abbau des Häms ist dessen Bindung an die HO, um einen stabilen Ferri-Häm-Komplex  $[\text{Häm}(\text{Fe}^{3+})\text{-HO}]$  zu bilden. Häm befindet sich in diesem Komplex zwischen zwei  $\alpha$ -Helices, der proximalen und der distalen Helix. Das Eisenatom der Hämgruppe ist direkt an einen in der proximalen Helix gelegenen Histidinrest gebunden. Dadurch wird Häm im Häm:HO-Komplex koordiniert und die Hydroxylierung am  $\alpha$ -*meso*-Kohlenstoff des Häms eingeleitet. Da dieser Histidinrest bei allen HOs hoch konserviert ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Hämkoordination aller BV IX $\alpha$  bildenden HOs sehr ähnelt (Abbildung 30). Spektroskopische und Kristallstrukturanalysen von HOs bestätigen die Koordination des Häms im Häm:HO-Komplex über den proximalen Histidinrest. Zusätzlich wird Häm noch durch ein distales Wassermolekül in Häm:HO-Komplexen koordiniert. Für BphO wurde anhand von Sequenzvergleichen His-20 als proximaler Ligand identifiziert.

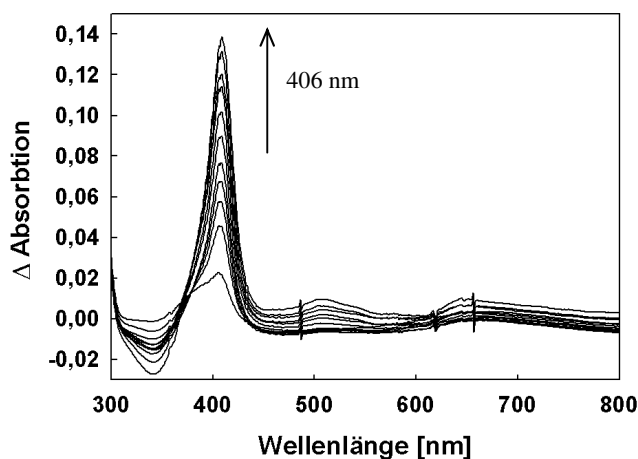
Um zu zeigen, dass His-20 aus BphO der proximale Häm-Ligand ist, wurde His-20 durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht. Die resultierende BphO-Variante H20A, wurde analog dem Wildtyp (WT) rekombinant produziert und unter Verwendung der Standard-Methoden auf ihre Hämoxygenase-Aktivität untersucht.

		M	E	R	P	Q	L	D	S	M	S	Q	D	L	S	E	A	L	K	E	A	T	K	E	V	H	I	R	A	E	N	Majority
											10										20										30	
1		M	-	-	-	-	-	-	-	-	S	V	N	L	A	S	Q	L	R	E	G	T	K	K	S	H	S	M	A	E	N	HO_Synechosystis.PRO
1		M	E	R	P	Q	L	D	S	M	S	Q	D	L	S	E	A	L	K	E	A	T	K	E	V	H	I	R	A	E	N	HO_Ratte.PRO
1		M	E	R	P	Q	L	D	S	M	S	Q	D	L	S	E	A	L	K	E	A	T	K	E	V	H	I	R	A	E	N	HO_Homo.PRO
1		M	S	P	S	P	S	P	A	L	A	-	-	-	-	-	A	L	R	D	A	T	R	D	L	H	A	E	L	D	R	BphO_Pseudomonas.PRO
		S	E	F	M	R	N	F	Q	K	G	Q	V	S	R	E	G	F	K	L	V	M	G	S	L	Y	H	I	Y	T	A	Majority
											40										50									60		
23		V	G	F	V	K	C	F	L	K	G	V	V	E	K	N	S	Y	R	K	L	V	G	N	L	Y	F	V	Y	S	A	HO_Synechosystis.PRO
31		S	E	F	M	R	N	F	Q	K	G	Q	V	S	R	E	G	F	K	L	V	M	A	S	L	Y	H	I	Y	T	A	HO_Ratte.PRO
31		S	E	F	M	R	N	F	Q	K	G	Q	V	S	R	E	G	F	K	L	V	M	A	S	L	Y	H	I	Y	T	A	HO_Homo.PRO
26		R	S	-	-	-	P	L	G	D	D	D	L	D	D	R	A	Y	L	D	H	A	G	R	I	L	G	W	L	E	P	BphO_Pseudomonas.PRO
		L	E	E	E	I	E	R	N	K	Q	N	P	V	Y	A	P	L	Y	F	P	E	E	L	H	R	R	A	A	L	E	Majority
											70										80									90		
53		M	E	E	E	M	A	K	F	K	D	H	P	I	L	S	H	I	Y	F	P	E	-	L	N	R	K	Q	S	L	E	HO_Synechosystis.PRO
61		L	E	E	E	I	E	R	N	K	Q	N	P	V	Y	A	P	L	Y	F	P	E	E	L	H	R	R	A	A	L	E	HO_Ratte.PRO
61		L	E	E	E	I	E	R	N	K	Q	N	P	V	Y	A	P	L	Y	F	P	E	E	L	H	R	R	A	A	L	E	HO_Homo.PRO
53		L	E	R	A	L	R	D	N	R	S	G	-	-	-	-	-	-	-	W	P	A	A	L	R	A	D	A	R	L	V	BphO_Pseudomonas.PRO
		Q	D	M	A	F	W	Y	G	S	H	W	Q	E	A	I	P	Y	T	P	A	T	Q	H	Y	V	K	R	L	H	E	Majority
											100										110									120		
82		Q	D	L	Q	F	Y	Y	G	S	N	W	R	Q	E	V	K	I	S	A	A	G	Q	A	Y	V	D	R	V	R	Q	HO_Synechosystis.PRO
91		Q	D	M	A	F	W	Y	G	P	H	W	Q	E	A	I	P	Y	T	P	A	T	Q	H	Y	V	K	R	L	H	E	HO_Ratte.PRO
91		Q	D	M	A	F	W	Y	G	P	H	W	Q	E	A	I	P	Y	T	P	A	T	Q	H	Y	V	K	R	L	H	E	HO_Homo.PRO
76		K	-	-	-	-	-	-	-	S	T	W	L	E	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BphO_Pseudomonas.PRO
		V	G	G	T	H	P	E	L	L	V	A	H	A	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	V	L	K	K	I	Majority
											130										140									150		
112		V	A	A	T	A	P	E	L	L	V	A	H	S	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	I	L	K	K	I	HO_Synechosystis.PRO
121		V	G	G	T	H	P	E	L	L	V	A	H	A	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	V	L	K	K	I	HO_Ratte.PRO
121		V	G	G	T	H	P	E	L	L	V	A	H	A	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	V	L	K	K	I	HO_Homo.PRO
83		-	-	-	-	-	D	L	L	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	M	S	R	A	Q	V	-	-	E	A	BphO_Pseudomonas.PRO
		A	Q	K	A	M	A	L	P	S	S	G	E	G	L	A	F	F	T	F	A	S	I	D	N	P	T	K	F	K	Q	Majority
											160										170									180		
142		A	Q	N	A	M	N	L	H	D	G	G	T	-	-	A	F	Y	E	F	A	D	I	D	D	E	K	A	F	K	N	HO_Synechosystis.PRO
151		A	Q	K	A	M	A	L	P	S	S	G	E	G	L	A	F	F	T	F	P	S	I	D	N	P	T	K	F	K	Q	HO_Ratte.PRO
151		A	Q	K	A	M	A	L	P	S	S	G	E	G	L	A	F	F	T	F	P	S	I	D	N	P	T	K	F	K	Q	HO_Homo.PRO
97		L	P	R	C	A	D	L	P	N	A	T	R	A	A	E	V	F	G	V	A	Y	V	M	E	G	A	T	L	G	G	BphO_Pseudomonas.PRO
		L	Y	R	A	R	M	N	T	L	E	M	T	P	E	V	K	H	R	V	T	E	E	A	K	T	A	F	L	L	N	Majority
											190										200									210		
170		T	Y	R	Q	A	M	N	D	L	P	I	D	Q	A	T	A	E	R	I	V	D	E	A	N	D	A	F	A	M	N	HO_Synechosystis.PRO
181		L	Y	R	A	R	M	N	T	L	E	M	T	P	E	V	K	H	R	V	T	E	E	A	K	T	A	F	L	L	N	HO_Ratte.PRO
181		L	Y	R	A	R	M	N	T	L	E	M	T	P	E	V	K	H	R	V	T	E	E	A	K	T	A	F	L	L	N	HO_Homo.PRO
127		A	Y	L	Y	K	R	L	A	P	R	L	P	G	L	P	L	Q	W	L	Q	G	Y	G	Q	A	T	G	V	R	W	BphO_Pseudomonas.PRO
		I	E	L	F	E	E	L	Q	A	L	L	T	E	E	H	K	-	-	-	D	Q	S	P	S	Q	T	E	F	L	R	Majority
											220										230									240		
200		M	K	M	F	N	E	L	E	G	N	L	I	K	A	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	HO_Synechosystis.PRO
211		I	E	L	F	E	E	L	Q	A	L	L	T	E	E	H	K	-	-	-	D	Q	S	P	S	Q	T	E	F	L	R	HO_Ratte.PRO
211		I	E	L	F	E	E	L	Q	A	L	L	T	E	E	H	K	-	-	-	D	Q	S	P	S	Q	T	E	F	L	R	HO_Homo.PRO
157		Q	E	F	L	E	Q	L	A	R	Q	I	D	S	P	E	A	I	G	L	A	Q	D	A	A	Q	A	T	F	L	S	BphO_Pseudomonas.PRO
		Q	R	P	A	S	L	V	Q	D	T	T	S	A	E	T	P	R	G	K	S	Q	I	S	T	S	S	S	Q	T	P	Majority
											250										260									270		
215		-	-	-	G	I	M	V	F	N	S	L	T	R	R	R	S	Q	G	S	T	E	V	G	L	A	T	S	E	G	HO_Synechosystis.PRO	
238		Q	R	P	A	S	L	V	Q	D	T	T	S	A	E	T	P	R	G	K	S	Q	I	S	T	S	S	S	Q	T	P	HO_Ratte.PRO
238		Q	R	P	A	S	L	V	Q	D	T	T	S	A	E	T	P	R	G	K	S	Q	I	S	T	S	S	S	Q	T	P	HO_Homo.PRO
187		F	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BphO_Pseudomonas.PRO
		L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M								Majority	
											280										290											
240		L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M								HO_Synechosystis.PRO	
268		L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M								HO_Ratte.PRO	
268		L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M								HO_Homo.PRO	
189		-	-	R	W	V	L	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	A						BphO_Pseudomonas.PRO		

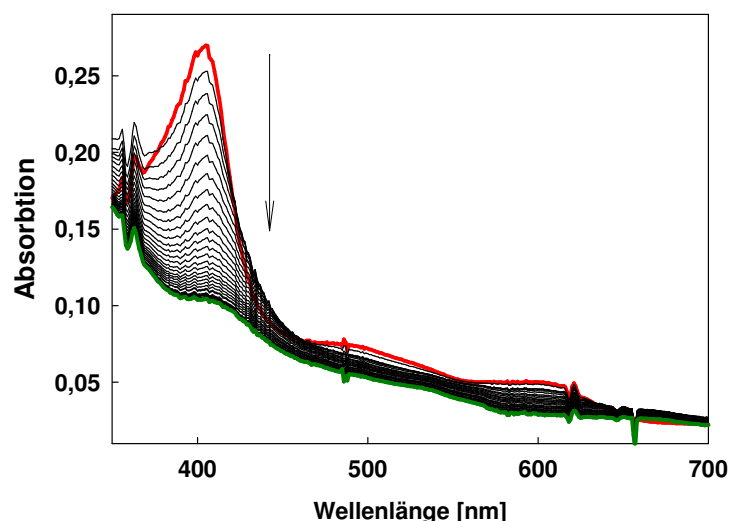
**Abbildung 30:** Aminosäuresequenzvergleich der HOs aus Mensch, Ratte, *Synechocystis* sp., und *P. aeruginosa*. Der Stern markiert den proximalen Histidinrest. Der schwarze Hintergrund zeigt identische Aminosäuren an.

#### 4.4.1 Die *P. aeruginosa* BphO-Variante H20A

Das gereinigte H20A Protein wies im Vergleich zum WT keine Grünfärbung auf. Dies deutete bereits darauf hin, dass die Variante H20A nicht in der Lage ist, während der Proteinproduktion in *E. coli* endogenes Häm zu BV umzusetzen. Nach der Titration der Variante H20A mit Häm konnte ein stabiler H20A:Häm-Komplex nachgewiesen werden (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Differenzspektren der Titration des Häms zu Variante H20A. Eine 1 mM Hämlösung wurde schrittweise (1-30  $\mu$ M) zu 10  $\mu$ M Variante H20A und in eine Referenzküvette titriert und das Spektrum zwischen 300 und 800 nm aufgenommen. Das Absorptionsmaximum für den H20A:Häm-Komplex liegt bei 406 nm.

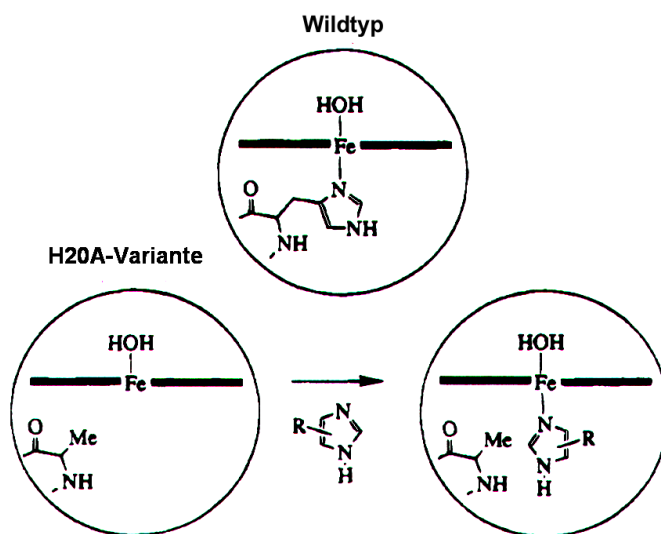


**Abbildung 32:** Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des H20A:Häm-Komplexes. Der H20A:Häm-Komplex (rot) wurde in Anwesenheit des reduzierten Ferredoxins abgebaut (grün).

Die Soretbande der Variante H20A liegt bei 406 nm und damit um ca. 3 nm kurzwelliger als die des WT (409 nm). Dies deutet auf eine Änderung in der Koordination des Häms in der Bindungstasche hin.

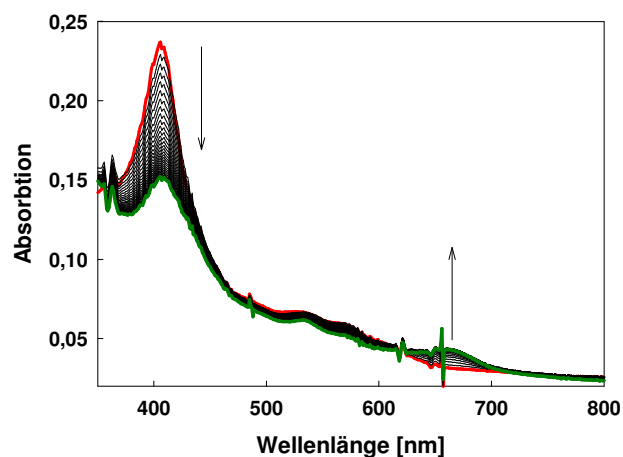
Die Variante H20A ist zwar in der Lage, Häm zu binden, aber nicht umzusetzen. Dies bestätigen die Untersuchungen der katalytischen Aktivität der Variante H20A im Standard-Enzymtest mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator (Abbildung 32). Das Endprodukt dieses unspezifischen Hämabbaus konnte nach Extraktion mit Pyridin als nicht umgesetztes Häm identifiziert werden.

Wie bereits beschrieben, wird das Eisenatom des Häms durch den neutralen Imidazol-Ring des Histidinrestes in der Bindungstasche koordiniert. Das Imidazol koordiniert das Eisenatom des Häms durch die räumliche Dehnung der Fe-N-Achse zu einem proximalen Eisen-Liganden innerhalb des Häm-H20A-Komplexes (Wilks *et al.*, 1995; Wilks und Moönne-Loccoz, 2000; Wilks, 2002). Ein schematisches Modell für die Bindung des Imidazols an die H20A-Variante ist in Abbildung 33 dargestellt.



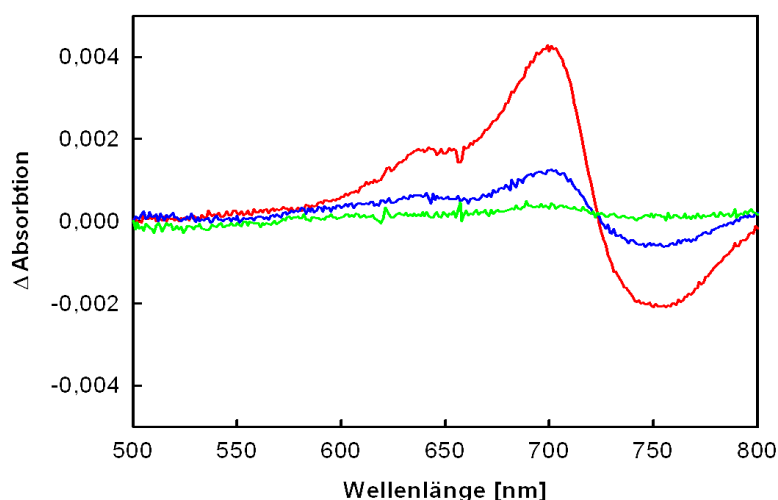
**Abbildung 33:** Schematisches Modell für die Bindung des Imidazols an die Variante H20A.

Durch Zugabe von exogenem Imidazol kann die enzymatische Aktivität der Variante H20A wieder hergestellt werden. Die katalytische Aktivität der Variante H20A in Anwesenheit von exogenem Imidazol ist in Abbildung 34 dargestellt. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 406 nm zu 400 nm und die Entstehung von zwei Peaks bei 533 nm und im Bereich von 650 nm bestätigten die Bildung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Verdohäm.



**Abbildung 34:** Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des H2O<sub>2</sub>:Häm-Komplexes. Der H2O<sub>2</sub>:Häm-Komplex (rot) wurde mit Imidazol titriert und anschließend in Anwesenheit von reduziertem Ferredoxin zu Verdohäm (grün) umgesetzt.

Liu und Ortiz de Montellano konnten 2000 den Unterschied in Absorptionsmaxima zwischen Fe<sup>3+</sup>-Verdohäm und Fe<sup>2+</sup>-Verdohäm in der katalytischen Umsetzung des HO-1:Häm-Komplexes der Säuger zeigen. Fe<sup>3+</sup>-Verdohäm hat drei Maxima bei 400, 535 und 680 nm, während Fe<sup>2+</sup>-Verdohäm zwei Maxima bei 400 und 650 nm hat. Um der Frage nachzugehen, welche Produkte bei der Umsetzung des ohne und mit Imidazol vervollständigten H2O<sub>2</sub>:Häm-Komplexes entstanden sind, wurden diese mit BphP inkubiert und anschließend Differenzspektren aufgenommen (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Charakterisierung der gebildeten Produkte nach der H2O<sub>2</sub>-Reaktion. Differenzspektrum von apo-BphP mit dem Produkt der Umsetzung des H2O<sub>2</sub>:Häm-Komplexes (grün); mit dem Produkt der Umsetzung des H2O<sub>2</sub>-Imidazol:Häm-Komplexes (blau) und mit Fe<sup>3+</sup>-BV (rot), dem Produkt der Umsetzung des BphO:Häm-Komplexes in Anwesenheit von Ascorbinsäure.



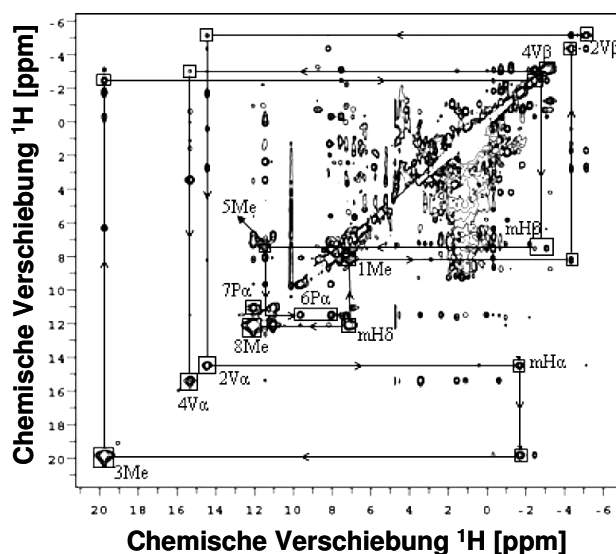
Die auf dem Differenzspektrum basierenden Ergebnisse belegen, dass bei der Umsetzung des mit Imidazol vervollständigten H2O<sub>2</sub>A:Häm-Komplexes ein lineares Tetrapyrrol gebildet wurde. Dies war bei der Reaktion ohne Imidazol nicht der Fall. Ob Eisen-BV oder freies BV als Endprodukt der Reaktion des mit Imidazol vervollständigten H2O<sub>2</sub>A:Häm-Komplexes entstand, konnte mittels UV-VIS-Spektrometrie nicht eindeutig geklärt werden. Aus diesem Grund wurde zu dem oben beschriebenen Reaktionsansatz Desferrioxamin, ein Eisenchelator, zugegeben, um die Freisetzung des Eisens und somit die Bildung des BVs zu fördern. Bei Bildung des freien BVs sollte bei 680 nm ein Absorptionsmaximum entstehen, was auch nach Zugabe von Desferrioxamin nicht nachgewiesen werden konnte. Die Entstehung des linearen Tetrapyrrols bei der Umsetzung des mit Imidazol vervollständigten H2O<sub>2</sub>A:Häm-Komplexes konnte nicht geklärt werden. Die oben beschriebenen Ergebnisse bestätigen aber eine wichtige Funktion des proximalen Histidinrestes 20 für die Koordination des Häms in dem BphO:Häm-Komplex und für die  $\alpha$ -meso-Hydroxylierung des Häms.

Der Effekt des Austausches des proximalen Liganden Histidin gegen Alanin wurde für humane HO-1 (His-25), HO-2 (His-45) und HmuO aus *C. diphtheriae* (His-20) beschrieben. Die humane H25A-Variante war vollständig inaktiv und erst durch Zugabe von Imidazol konnte katalytische Aktivität hergestellt werden (Wilks *et al.*, 1995). Die *C. diphtheriae* H20A-Variante dagegen konnte auch ohne Imidazol Häm binden und zu Ferro-Verdohäm umsetzen. Nach der Zugabe von Imidazol zum Zwischenprodukt, konnte Verdohäm zu BV umgesetzt werden (Wilks und Moönne-Loccoz, 2000). Somit ist der Histidinrest für die Koordination des Häms und die folgende  $\alpha$ -meso-Hydroxylierung nur bei der humanen HO-1 von essenzieller Bedeutung, während es für die katalytische Aktivität der HmuO aus *C. diphtheriae* nicht erforderlich ist. Der Grund dafür konnte bis heute nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Hemmung der Hämoxygenase-Aktivität durch Freisetzung von CO während der oxidativen Spaltung des Häms im Fall der *C. diphtheriae* H20A-Variante. Eine zweite Erklärung wäre, dass eine Vervollständigung der katalytischen Aktivität der H20A-Variante durch Titration mit exogenem Imidazol aufgrund der Polarität der Bindungstasche, des Redoxpotentials vom Eisenatom oder der Geometrie des Moleküles nicht erreicht werden kann.

#### 4.4.2 Spektroskopische Charakterisierung des *P. aeruginosa* BphOs mittels NMR-Spektroskopie

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz (NMR, *nuclear magnetic resonance*) ermöglicht es, auf die Proteinstruktur von BphO und PgaA aus *P. aeruginosa* zu schließen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies an der Universität Kansas im Institut für Chemie in Lawrence, Kansas USA, von Mario Rivera durchgeführt und ausgewertet.

Die einzelnen Schritte der NMR-Spektroskopie wurden im Methodenteil (Kapitel 3.8) beschrieben. Für die Aufklärung der Proteinstruktur wurden HMQC-Spektren in Kombination mit eindimensionalen, nicht-gekoppelten  $^{13}\text{C}$ -Spektren aufgenommen. Die Strukturinformation für BphO wurde aus der Korrelation von Protonen aufgrund ihrer räumlichen Beziehung für  $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren des mit Cyanid inhibierten Häm:BphO-Komplexes gezogen (BphO-CN) (Abbildung 36). Die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -NOESY-Spektroskopie von BphO sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

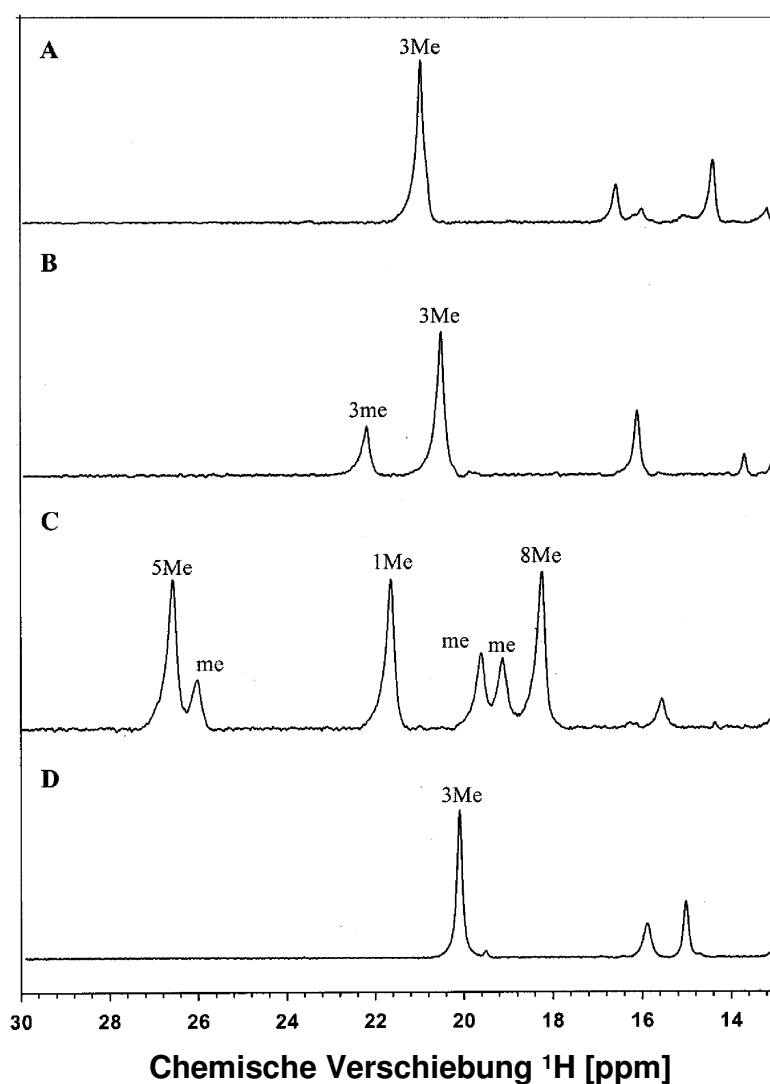


**Abbildung 36:** WEFT-NOESY-Spektrum vom BphO:CN-Komplex. Die chemische Verschiebung von  $^1\text{H}$  markierten Methylgruppen aus Häm:BphO-CN ist auf der X-Achse von rechts nach links in ppm aufgetragen.

**Tabelle 11:** Chemische Verschiebung der Methylgruppen aus  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Häm. Die radioaktiv markierten BphO:Häm-Komplexe wurden mit Cyanid inhibiert und anschließend die NOESY-Spektren aufgenommen.

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1 Me	8,41	-18,43
3 Me	19,73	-45,17
5 Me	11,42	-24,64
8 Me	12,03	-28,91

2 Va	14,41	-
2 Vb	-4,40; -5,17	188,27
4 Va	15,31	-
4 Vb	-2,25; -2,51	148,63
meso- $\alpha$	-1,35	51,89
meso- $\beta$	8,00	3,37
meso- $\gamma$	-	-
meso- $\delta$	7,19	17,78
6 P $\alpha$	8,04; 9,65	-
6 P $\beta$	1,13; -0,56	116,97
7 P $\alpha$	11,01; 7,31	-
7 P $\beta$	-1,01; -2,06	109,68

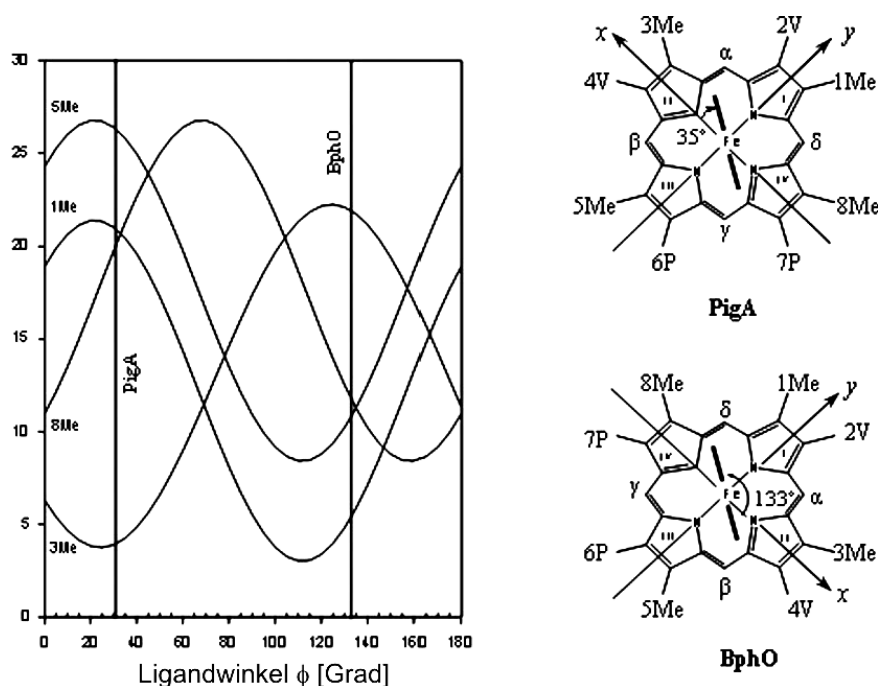


**Abbildung 37:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der mit  $^1\text{H}$  markierten und mit Cyanid inhibierten HemO (A), HmuO (B), PigA (C) und BphO (D). Aufgrund der Methylresonanz des Häms wurde 3Me bei allen bekannten HOs mit  $\alpha$ -meso-Hydroxylierung festgestellt. Der gleiche Bereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums bei PigA (C) zeigt drei Methylresonanzen des Häms. Die Resonanz in dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von PigA zeigt, dass deren Häm um  $110^\circ$  gedreht ist und die Achse des proximalen Histidin-Imidazols parallel zu der  $\alpha$ - $\gamma$ -meso-Achse liegt.

Durch den Vergleich von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren anderer HOs konnte eine Regioselektivität der Hydroxylierung am  $\alpha$ -*meso*-Kohlenstoff und "in-plane" Orientierung in der Ebene des Häms nachgewiesen werden (Caignan *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2004). In diesem Fall zeigen die HOs, die BV IX $\alpha$  als Endprodukt der katalytischen Umsetzung haben, nur ein Maxi-Signal der chemischen Verschiebung der Methylgruppe (3Me) bei einer Frequenz von 12 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. In den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der mit Cyanid inhibierten HOs, wie HemO aus *N. meningitidis* (Abbildung 37, A) und HmuO aus *C. diphtheriae* (Abbildung 37, B) sind deutlich Maxi-Signale (3Me) der chemischen Verschiebung der Methylgruppe zu erkennen. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des mit Cyanid inhibierten PigA aus *P. aeruginosa* unterscheidet sich stark von den Spektren der BV IX $\alpha$  produzierenden HOs. Es zeigt folgende Maxi-Signale der chemischen Verschiebung der Methylgruppe: 5Me, 1Me und 8Me (Abbildung 37, C). Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von BphO-CN (Abbildung, D) weist das typische für die BV IX $\alpha$  produzierenden HOs Maxi-Signal (3Me) auf. Die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bestätigen die Tatsache, dass BV IX $\alpha$  das Endprodukt der katalytischen Umsetzung des Häms durch BphO ist.

Die chemische Verschiebung von vier Methylgruppen des Häms aus BphO (3Me) und PigA (5Me, 1Me und 8Me) könnte im Zusammenhang mit der Funktion des Torsionswinkels zwischen der Ebene des Imidazols aus Histidin und der molekularen X-Achse interpretiert werden. Diese Interpretation ermöglicht eine Voraussage über die Geometrie der Moleküle für beide Proteine (Abbildung 38).

Für PigA konnte ein Torsionswinkel von  $35^\circ$  ermittelt werden. Diese Ergebnisse ermöglichen eine Vorhersage, dass Häm in PigA um ca  $110^\circ$  in der Ebene gedreht ist. Dadurch rückt die  $\delta$ -Kohlenstoffbrücke an die Stelle, an der in BV IX $\alpha$  bildenden HOs die  $\alpha$ -*meso*-Kohlenstoffbrücke ist. Die Kristallstruktur von PigA bestätigt diese Ergebnisse (Friedman *et al.*, 2004). Für BphO konnte der Torsionswinkel von  $133^\circ$  in der proximalen Histidin-Imidazol-Ebene mit Berücksichtigung der molekularen X-Achse ermittelt werden. Die räumliche Platzierung des Häms innerhalb von BphO ermöglicht eine Hydroxylierung des  $\alpha$ -*meso*-Kohlenstoffes und somit die Entstehung des  $\alpha$ -*meso*-Hydroxyhäms als Vorstufe für BV IX $\alpha$ . Die Reihenfolge in der Häm-Methyl-Resonanz, 3Me, 8Me, 5Me und 1Me bestätigt die Ausbildung eines Torsionswinkels von  $133^\circ$  in der proximalen Histidin-Imidazol-Ebene mit Berücksichtigung der molekularen X-Achse bei BphO (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Chemische Verschiebung der Methylgruppe des Häm aus BphO und PigA in Abhängigkeit des Torsionswinkels. In allen BV IX $\alpha$  produzierenden HOs, inklusive BphO, verläuft die Ebene des Imidazols aus Histidin fast parallel zu der  $\delta$ - $\beta$ -meso-Achse des Häms. Anhand des Zustands und der Position von chemischer Verschiebung der Methylgruppe in BphO konnte ein Torsionswinkel von 133° ermittelt werden. Für PigA beträgt der Torsionswinkel 35°.

#### 4.4.3 Interaktion zwischen BphO und BphP

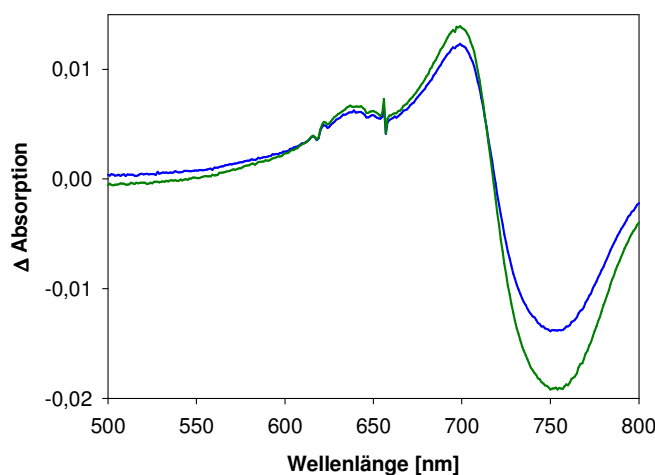
Die rekombinante Produktion von BphO als auch von PigA führt zu einem stabilen BphO:BV-Komplex bzw. PigA:BV-Komplex. Das an BphO gebundene BV konnte mittels GPC, Ionenaustauschchromatographie (IEC) und Dialyse in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten nicht von dem Komplex getrennt werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe Affinität des BVs zu BphO und PigA hin. Die Freisetzung des BVs am Ende der katalytischen Umsetzung des Häms wurde als der geschwindigkeitslimitierende Schritt für andere HOs beschrieben. In dem Fall der HO aus Säugetieren wird das entstehende BV von Biliverdinreduktase (BVR), einem nachfolgenden Enzym im Häm katabolismus, zu Bilirubin (BR) umgesetzt. BVR beschleunigt die Freisetzung des BVs (Liu und Ortiz de Montellano, 2000). *P. aeruginosa* besitzt kein Enzym mit Homologie zu BVR aus Säugetieren. Deswegen wäre es möglich, dass in *P. aeruginosa* ein anderes Protein diese Funktion übernimmt.

Aufgrund des Aufbaus des Operons, das sowohl das *bphO*-Gen als auch das *bphP*-Gen beinhaltet, sollten mögliche Interaktionen zwischen den rekombinanten Proteinen BphO und BphP in Zusammenarbeit mit Dr. R. Tasler untersucht und charakterisiert werden.

#### 4.4.4 Interaktion zwischen BphO:BV-, PigA:BV-Komplexen und BphP

Bhoo *et al.*, 2001 haben postuliert, dass das *bphO*-Genprodukt für die Biosynthese des BVs und somit des funktionalen Phytochroms essenziell ist. Es war somit von Interesse zu untersuchen, ob BphP in der Lage ist, BV aus einem BphO:BV und außerdem aus PigA:BV zu binden. Dafür wurde apo-BphP mit rekombinant gereinigten BphO:BV- und PigA:BV-Komplexen inkubiert und anschließend spektroskopisch charakterisiert (Tasler *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der Differenzspektren zeigen, dass apo-BphP BV sowohl aus dem BphO:BV- als auch aus dem PigA:BV-Komplex bindet und aktives holo-BphP bildet (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Charakterisierung der Interaktion zwischen apo-BphP und BphO:BV- und PigA:BV-Komplexen. Differenzspektrum von apo-BphP und BphO:BV (grün) und PigA:BV (blau).

Bei der Hämoxygenase-Reaktion von PigA entsteht allerdings eine Mischung aus BV IX $\beta$  und BV IX $\delta$  im Verhältnis von 30:70. Neben BphO könnte auch die PigA den Chromophor für BphP liefern. Die Expression von *pigA* verläuft nur unter eisenlimitierenden Bedingungen. Außerdem ist BV IX $\beta$  das natürliche Produkt der PigA-Reaktion, wobei BV IX $\delta$  überwiegend bei der rekombinanten Produktion entsteht. Dr. R. Tasler konnte zeigen, dass nur BV IX $\delta$  an BphP gebunden werden kann. Somit ist auszuschließen, dass PigA den Chromophor für BphP liefert (Tasler *et al.*, 2005).

#### 4.4.5 Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels Gelpermeationschromatographie

Mittels Gelpermeationschromatographie konnte gezeigt werden, dass apo-BphP in der Lage ist, BV aus einem BphO:BV zu binden. Dieses Experiment wurde von Dr. Ronja

Tasler in unserem Labor durchgeführt. Die Elution der Proteine wurde sowohl bei 280 nm als auch bei 650 nm (Absorptionsmaximum für BV) verfolgt. Aus Messung des Absorptionsmaximums des BVs bei 650 nm wurde festgestellt, dass BV aus dem BphO:BV-Komplex nach der Inkubation und GPC-Analyse mit *PaBphP* assoziiert war. Diese Beobachtung wurde zusätzlich mittels Zink-induzierter roter Fluoreszenz (Berkelman und Lagarias, 1986) überprüft, um kovalente Bindung zwischen BphP und BV nachzuweisen (Daten nicht gezeigt, Tasler, 2006, Dissertation). *PaBphP* ist in der Lage, mit dem BphO:BV-Komplex zu interagieren und somit die Freisetzung des BVs zu beschleunigen. Diese Ergebnisse belegen, dass die Hämoxygenase BphO aus *P. aeruginosa* einen natürlichen Chromophor für das bakterielle Phytochrom BphP produziert. Die Aktivität von BphO aus *P. aeruginosa* könnte durch die Interaktion zwischen BphP und BphO reguliert werden.

#### **4.4.6 Mutagenesestudien zur Charakterisierung der Interaktion zwischen BphO und BphP**

Um diese potentielle Interaktion zwischen BphO und BphP genauer zu untersuchen, sollten Mutagenesestudien durchgeführt werden. Dessen lag die Hypothese zugrunde, dass HOs sowohl mit ihrem entsprechenden Redoxpartner als auch mit dem nachfolgenden Enzym BVR über identische Bindungsstellen interagieren. Analog dazu könnte BphO Bindungsstellen für Ferredoxin und BphP besitzen.

Bei der katalytischen Umsetzung des Häms durch die humane Hämoxygenase (HO-1) werden Elektronen von NADPH Cytochrom P450 Reduktase (CPR) geliefert. Anschließend wird das entstehende Produkt BV von BVR reduziert, wobei Bilirubin entsteht. Wang und Ortiz de Montellano (2003) konnten anhand von Mutagenesestudien und FRET-Experimenten (FRET, *fluorescent energy transfer technique*) zeigen, dass die Elektronenübertragung über einen transienten CPR:HO-1-Komplex stattfindet und BVR über ionische und elektrostatische Wechselwirkungen mit HO-1 interagiert. Für die Untersuchung der Interaktion zwischen HO-1, CPR und BVR wurden in Frage kommende Aminosäuren durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Alanine ausgetauscht. Die Ergebnisse zeigten, dass die beiden Enzyme, CPR und BVR, um die Bindungsstellen an HO-1 konkurrieren, da sich die Bindungsstellen überlappen (Wang und Ortiz de Montellano, 2003). Vergleiche der Kristallstrukturen bekannter HOs zeigen eine starke Variation der Aminosäuren, die an der Oberfläche liegen. Hinsichtlich ihrer positiven bzw. negativen Ladung stimmen nur wenige überein. Aufgrund der Aminosäuresequenz-

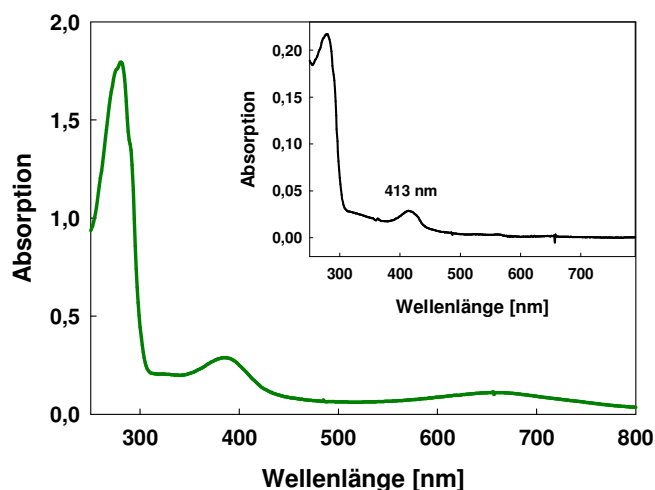
vergleiche von HOs wurden die für die Interaktion zwischen BphO und BphP in Frage kommenden Aminosäuren an der BphO-Oberfläche identifiziert (Abbildung 40). Die Aminosäuren R13, R17, N81, und K129 wurden durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Alanine ausgetauscht.

	M	E	R	P	Q	L	D	S	M	S	Q	D	L	S	E	A	L	K	E	A	T	K	E	V	H	I	R	A	E	N	Majority
										10										20										30	
1	M	-	-	-	-	-	-	-	S	V	N	L	A	S	Q	L	R	E	G	T	K	K	S	H	S	M	A	E	N	HO_Synechosystis.PRO	
1	M	E	R	P	Q	L	D	S	M	S	Q	D	L	S	E	A	L	K	E	A	T	K	E	V	H	I	R	A	E	N	HO_Ratte.PRO
1	M	S	P	S	P	S	P	A	L	A	-	-	-	-	-	A	L	R	D	A	T	R	D	L	H	A	E	L	D	R	BphO_Pseudomonas.PRO
	S	E	F	M	R	N	F	Q	K	G	Q	V	S	R	E	G	F	K	L	V	M	G	S	L	Y	H	I	Y	T	A	Majority
											40										50									60	
23	V	G	F	V	K	C	F	L	K	G	V	V	E	K	N	S	Y	R	K	L	V	G	N	L	Y	F	V	Y	S	A	HO_Synechosystis.PRO
31	S	E	F	M	R	N	F	Q	K	G	Q	V	S	R	E	G	F	K	L	V	M	A	S	L	Y	H	I	Y	T	A	HO_Ratte.PRO
31	S	E	F	M	R	N	F	Q	K	G	Q	V	S	R	E	G	F	K	L	V	M	A	S	L	Y	H	I	Y	T	A	HO_Homo.PRO
26	R	S	-	-	-	P	L	G	D	D	D	L	D	D	R	A	Y	L	D	H	A	G	R	I	L	G	W	L	E	P	BphO_Pseudomonas.PRO
	L	E	E	E	I	E	R	N	K	Q	N	P	V	Y	A	P	L	Y	F	P	E	E	L	H	R	R	A	A	L	E	Majority
											70										80									90	
53	M	E	E	E	M	A	K	F	K	D	H	P	I	L	S	H	I	Y	F	P	E	-	L	N	R	K	Q	S	L	E	HO_Synechosystis.PRO
61	L	E	E	E	I	E	R	N	K	Q	N	P	V	Y	A	P	L	Y	F	P	E	E	L	H	R	R	A	A	L	E	HO_Ratte.PRO
61	L	E	E	E	I	E	R	N	K	Q	N	P	V	Y	A	P	L	Y	F	P	E	E	L	H	R	R	A	A	L	E	HO_Homo.PRO
53	L	E	R	A	L	R	D	N	R	S	G	-	-	-	-	-	-	W	P	A	A	L	R	A	D	A	R	L	V	BphO_Pseudomonas.PRO	
	Q	D	M	A	F	W	Y	G	S	H	W	Q	E	A	I	P	Y	T	P	A	T	Q	H	Y	V	K	R	L	H	E	Majority
											100										110									120	
82	Q	D	L	Q	F	Y	Y	G	S	N	W	R	Q	E	V	K	I	S	A	A	G	Q	A	Y	V	D	R	V	R	Q	HO_Synechosystis.PRO
91	Q	D	M	A	F	W	Y	G	P	H	W	Q	E	A	I	P	Y	T	P	A	T	Q	H	Y	V	K	R	L	H	E	HO_Ratte.PRO
91	Q	D	M	A	F	W	Y	G	P	H	W	Q	E	A	I	P	Y	T	P	A	T	Q	H	Y	V	K	R	L	H	E	HO_Homo.PRO
76	K	-	-	-	-	-	-	-	S	T	W	L	E	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BphO_Pseudomonas.PRO
	V	G	G	T	H	P	E	L	L	V	A	H	A	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	V	L	K	K	I	Majority
											130										140									150	
112	V	A	A	T	A	P	E	L	L	V	A	H	S	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	I	L	K	K	I	HO_Synechosystis.PRO
121	V	G	G	T	H	P	E	L	L	V	A	H	A	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	V	L	K	K	I	HO_Ratte.PRO
121	V	G	G	T	H	P	E	L	L	V	A	H	A	Y	T	R	Y	L	G	D	L	S	G	G	Q	V	L	K	K	I	HO_Homo.PRO
83	-	-	-	-	-	-	D	L	L	A	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	M	S	R	A	Q	V	-	-	E	A	BphO_Pseudomonas.PRO
	A	Q	K	A	M	A	L	P	S	S	G	E	G	L	A	F	F	T	F	A	S	I	D	N	P	T	K	F	K	Q	Majority
											160										170									180	
142	A	Q	N	A	M	N	L	H	D	G	G	T	-	-	A	F	Y	E	F	A	D	I	D	D	E	K	A	F	K	N	HO_Synechosystis.PRO
151	A	Q	K	A	M	A	L	P	S	S	G	E	G	L	A	F	F	T	F	P	S	I	D	N	P	T	K	F	K	Q	HO_Ratte.PRO
151	A	Q	K	A	M	A	L	P	S	S	G	E	G	L	A	F	F	T	F	P	S	I	D	N	P	T	K	F	K	Q	HO_Homo.PRO
97	L	P	R	C	A	D	L	P	N	A	T	R	A	A	E	V	F	G	V	A	Y	V	M	E	G	A	T	L	G	G	BphO_Pseudomonas.PRO
	L	Y	R	A	R	M	N	T	L	E	M	T	P	E	V	K	H	R	V	T	E	E	A	K	T	A	F	L	L	N	Majority
											190										200									210	
170	T	Y	R	Q	A	M	N	D	L	P	I	D	Q	A	T	A	E	R	I	V	D	E	A	N	D	A	F	A	M	N	HO_Synechosystis.PRO
181	L	Y	R	A	R	M	N	T	L	E	M	T	P	E	V	K	H	R	V	T	E	E	A	K	T	A	F	L	L	N	HO_Ratte.PRO
181	L	Y	R	A	R	M	N	T	L	E	M	T	P	E	V	K	H	R	V	T	E	E	A	K	T	A	F	L	L	N	HO_Homo.PRO
127	A	Y	L	Y	K	R	L	A	P	R	L	P	G	L	P	L	Q	W	L	Q	G	Y	G	Q	A	T	G	V	R	W	BphO_Pseudomonas.PRO
	I	E	L	F	E	E	L	Q	A	L	L	T	E	E	H	K	-	-	-	D	Q	S	P	S	Q	T	E	F	L	R	Majority
											220										230									240	
200	M	K	M	F	N	E	L	E	G	N	L	I	K	A	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	HO_Synechosystis.PRO	
211	I	E	L	F	E	E	L	Q	A	L	L	T	E	E	H	K	-	-	-	D	Q	S	P	S	Q	T	E	F	L	R	HO_Ratte.PRO
211	I	E	L	F	E	E	L	Q	A	L	L	T	E	E	H	K	-	-	-	D	Q	S	P	S	Q	T	E	F	L	R	HO_Homo.PRO
157	Q	E	F	L	E	Q	L	A	R	Q	I	D	S	P	E	A	I	G	L	A	Q	D	A	A	Q	A	T	F	L	S	BphO_Pseudomonas.PRO
	Q	R	P	A	S	L	V	Q	D	T	T	S	A	E	T	P	R	G	K	S	Q	I	S	T	S	S	S	Q	T	P	Majority
											250										260									270	
215	-	-	-	G	I	M	V	F	N	S	L	T	R	R	R	S	Q	G	S	T	E	V	G	L	A	T	S	E	G	HO_Synechosystis.PRO	
238	Q	R	P	A	S	L	V	Q	D	T	T	S	A	E	T	P	R	G	K	S	Q	I	S	T	S	S	S	Q	T	P	HO_Ratte.PRO
238	Q	R	P	A	S	L	V	Q	D	T	T	S	A	E	T	P	R	G	K	S	Q	I	S	T	S	S	S	Q	T	P	HO_Homo.PRO
187	F	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BphO_Pseudomonas.PRO	
	L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M	-	-	-	-	-	-	-	Majority	
											280										290										
240	L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M	-	-	-	-	-	-	-	HO_Synechosystis.PRO	
268	L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M	-	-	-	-	-	-	-	HO_Ratte.PRO	
268	L	L	R	W	V	L	T	L	S	F	L	L	A	T	V	A	V	G	I	Y	A	M	-	-	-	-	-	-	-	HO_Homo.PRO	
189	-	-	R	W	V	L	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	A	-	-	-	-	-	-	BphO_Pseudomonas.PRO		

**Abbildung 40:** Aminosäuresequenzvergleich der HOs aus Mensch, Ratte, *Synechocystis sp.*, und *P. aeruginosa*. Sterne markieren Aminosäuren, die an der Interaktion zwischen BphO und BphP beteiligt sein können. Der schwarze Hintergrund zeigt identische Aminosäuren an.



Die entsprechenden BphO-Varianten R13A, R17A, N81A und K129A wurden analog dem Wildtyp rekombinant produziert. Die erhaltenen Mutanten wurden unter Verwendung des Enzymtests in Bezug auf ihre Rolle in der Interaktion zwischen BphO und BphP untersucht. Die gereinigten BphO-Varianten R13A, R17A, N81A und K129A zeigten während der Produktion in *E. coli* keine Grünfärbung. Diese Varianten sind wahrscheinlich nicht in der Lage, Häm zu BV umzusetzen. Abbildung 41 zeigt das Absorptionsspektrum der gereinigten Varianten am Beispiel der N81A Mutante im Vergleich zum Absorptionsspektrum des WT BphO. Diese Variante N81A zeigt eine Soretbande bei 413 nm, während WT BphO zwei Absorptionsmaxima des BV bei 350 nm und 650 nm aufweist.



**Abbildung 41:** Spektroskopische Charakterisierung der N81A Variante und des WTs BphO. Es wurden UV/VIS-Spektren von rekombinant gereinigtem WT (grün) und N81A Variante (Insert) aufgenommen. Der Variante fehlte das typische Absorptionsspektrum für Biliverdin, wobei ein Absorptionsmaximum des Häms bei 413 nm vorhanden war.

Titrationsexperimente mit Häm zeigten, dass alle Varianten in der Lage waren, Häm *in vitro* zu binden. Allerdings sind die Soretbanden der Hämkomplexe der Varianten im Gegensatz zum WT leicht verschoben, was auf eine andere Hämkoordination in der Bindungstasche hindeutet (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Spektrale Eigenschaften der BphO-Varianten komplexiert mit Häm.

Protein:Häm-Komplex	Absorptionsmaximum [nm]
BphO-Häm	409
R13A-Häm	405
R17A-Häm	406
N81A-Häm	405
K129A-Häm	406

Die Aktivitätstests der einzelnen Mutanten wurden nach Standardbedingungen (Kapitel 3.7.5) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Untersuchung auf die Hämoxygenaseaktivität der R13A, R17A, N18A und K129A Varianten

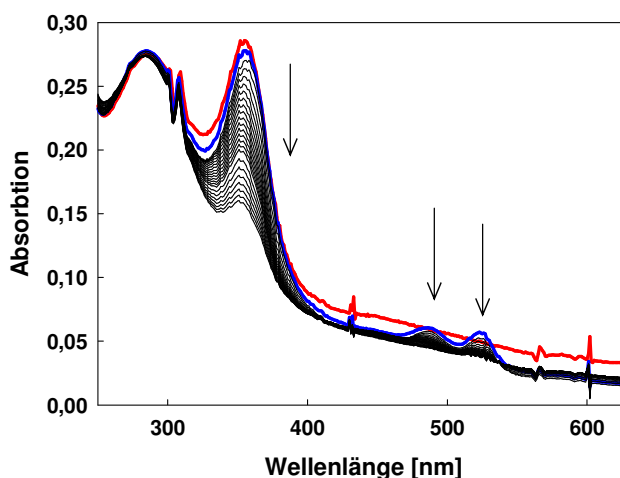
Reduktionsmittel	Reaktionsschritt	Endprodukt	Differenzspektrum
<b>WT-BphO</b>			
Ferredoxin	545 nm, 579 nm	Oxyferro-Komplex	
Ascorbinsäure	650 nm	Biliverdin	positiv
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	398 nm 650 nm	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin	positiv
Ascorbinsäure (alleine)	380 - 400 nm	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin	positiv
<b>R13A</b>			
Ferredoxin	Abbau	n.m. <sup>1</sup>	negativ
Ascorbinsäure	n.m. <sup>1</sup>	n.m. <sup>1</sup>	negativ
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	380 - 400 nm	n.m. <sup>1</sup>	negativ
Ascorbinsäure (alleine)	n.m. <sup>1</sup>	n.m. <sup>1</sup>	negativ
<b>R17A</b>			
Ferredoxin	540 nm, 578 nm	Oxyferro-Komplex	positiv
Ascorbinsäure	Abbau	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin	positiv
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	380 - 400 nm	n.m. <sup>1</sup>	negativ
Ascorbinsäure (alleine)	n.m. <sup>1</sup>	n.m. <sup>1</sup>	negativ
<b>R81A</b>			
Ferredoxin	Abbau 540 nm, 578 nm	Oxyferro-Komplex	positiv
Ascorbinsäure	380 - 400 nm	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin	positiv
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	380 - 400 nm	n.m. <sup>1</sup>	negativ
Ascorbinsäure (alleine)	n.m. <sup>1</sup>	n.m. <sup>1</sup>	negativ
<b>K129A</b>			
Ferredoxin	Abbau 540 nm, 578 nm	n.m. <sup>1</sup>	n.m. <sup>1</sup>
Ascorbinsäure	380 - 400 nm	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin	positiv
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	380 - 400 nm	n.m. <sup>1</sup>	negativ
Ascorbinsäure (alleine)	Abbau 380 - 400 nm	Fe <sup>3+</sup> -Biliverdin	positiv

n.m.<sup>1</sup> nicht messbar

Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass die Variante R13A keine Aktivität besitzt. Die Interaktion zwischen BphO und Ferredoxin wird verhindert und deswegen kann keine Elektronenübertragung stattfinden.

Im Gegensatz hierzu besitzen die Varianten R17A, N81A und K129A katalytische Aktivität, die der katalytischen Aktivität des WT BphO ähnelt. Die enzymatische Umsetzung von Häm in Anwesenheit von reduziertem Ferredoxin führte bei den Varianten

R17A, N81A und K129A zu Eisen-BV, was am Beispiel der Variante R17A dargestellt ist (Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Spektroskopische Charakterisierung der katalytischen Umsetzung des R17A:Häm-Komplexes. Der R17A:Häm-Komplex wurde in Anwesenheit des reduzierten Ferredoxins über Oxyferro-Komplex (rot) zu  $\text{Fe}^{3+}$ -BV.

In Anwesenheit eines zweiten Reduktionspartners, Ascorbinsäure, konnte nur der Abbau des HO:Häm-Komplexes für die Varianten R17A, N81A und K129A gezeigt werden. In den Ansätzen mit Ascorbinsäure allein als Reduktionsmittel konnten bei den Varianten R17A und N81A keine erkennbaren Ergebnisse beobachtet werden, während bei der Variante K129A das Endprodukt Eisen-BV nachgewiesen werden konnte. Die gekoppelte Oxidation mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte bei allen Varianten zum Abbau des Häm:HO-Komplexes. Das Endprodukt dieser Umsetzung konnte bei allen Varianten nicht differenziert werden. Um festzustellen, ob in den über Ferredoxin und Ascorbinsäure vermittelten Reaktionen aller Varianten freies BV oder  $\text{Fe}^{3+}$ -BV gebildet wurde und ob das gebildete Produkt als Chromophor von BphP aus *P. aeruginosa* akzeptiert und kovalent gebunden wird, erfolgte eine Inkubation aller Ansätze mit apo-BphP und eine anschließende Aufnahme von Differenzspektren (Tabelle 13).

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente zeigen, dass *in vitro* bei der durch die R17A, N81A und K129A Varianten katalysierten Reaktionen lineares Tetrapyrrol gebildet wird, das von BphP aus *P. aeruginosa* als Chromophor akzeptiert wird. Dies wurde durch aufgenommene Differenzspektren nachgewiesen. Die R13A Variante *in vitro* ist völlig inaktiv. Dafür kommen folgende Gründe in Frage. Die Elektronenübertragung wird durch Ersatz von Arginin 13 durch Alanin gestört bzw. Arginin 13 könnte eine wichtige katalytische Funktion erfüllen. Dies kann jedoch fast ausgeschlossen werden, da diese

Aminosäuren höchstwahrscheinlich an der Oberfläche des Proteins liegt. Für die R17A, N81A und K129A Varianten konnte *in vitro* HO-Aktivität gezeigt werden. Somit sind die R17, N81 und K129 für die HO-Aktivität generell nicht notwendig. Wenn die Aminosäuren R13, R17 und K129 an der Interaktion beteiligt wären, müsste katalytische Umsetzung des Häms langsamer verlaufen. Da allerdings *in vivo* ein anderer Elektronendonator an der Reaktion teilnimmt, könnten diese Aminosäuren für diesen Elektronendonator essenziell sein.

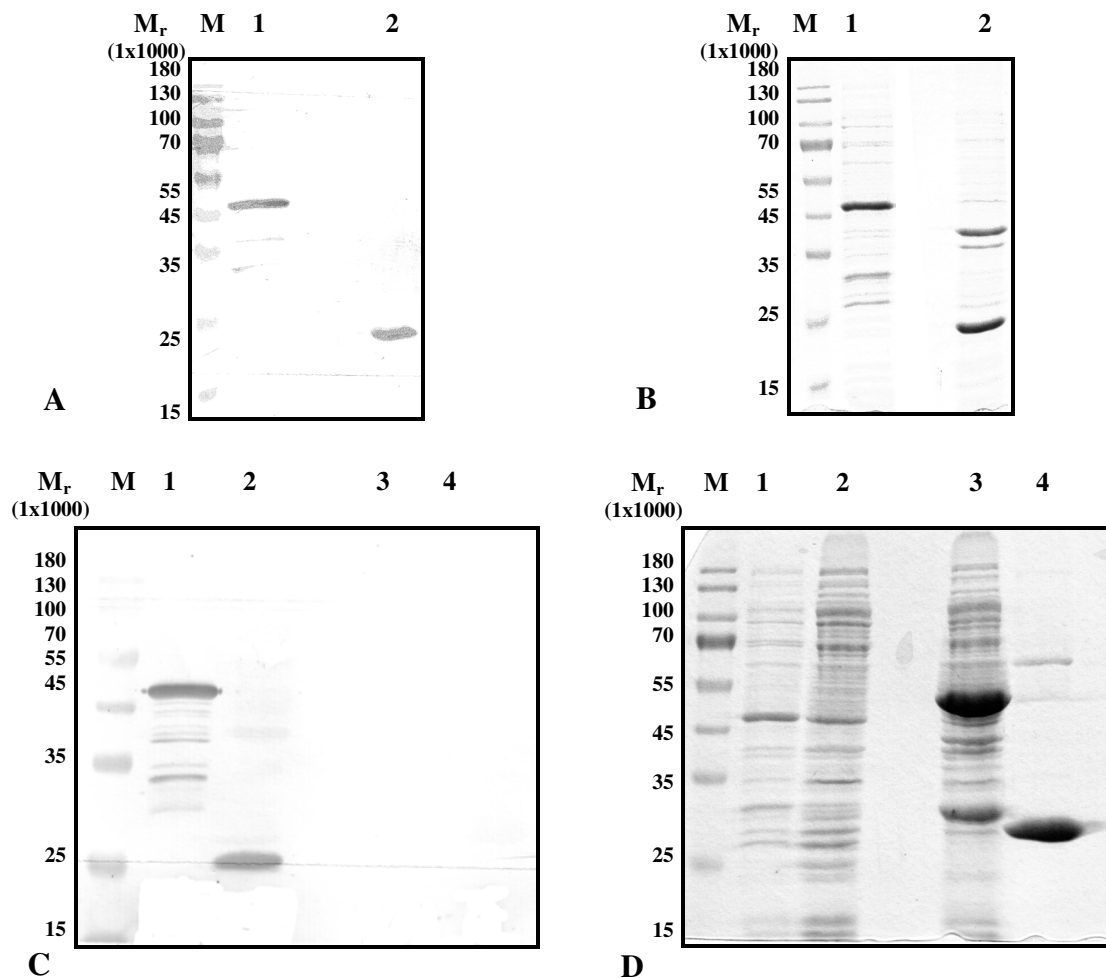
GPC-Experimente zur Untersuchung der Interaktion zwischen BphO und BphP mit den Varianten R13A, R17A, N81A und K129A konnten aufgrund der geringen Produktion von BV nicht durchgeführt werden.

#### **4.4.7 Immunopräzipitation**

Die Möglichkeit einer Wechselwirkung von BphO und BphP sollte mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationsexperimenten untersucht werden. Die Immunopräzipitation ermöglicht den Nachweis der Bindungsfähigkeit eines Antikörpers für ein konformationssensitives Epitop im Antigen. Weiterhin ist diese Methode dafür geeignet, in einem Zellextrakt auch ein schwach exprimiertes Antigen zu detektieren, da es durch die Komplexierung mit Antikörper und Protein-A-Sepharose (PAS) angereichert wird.

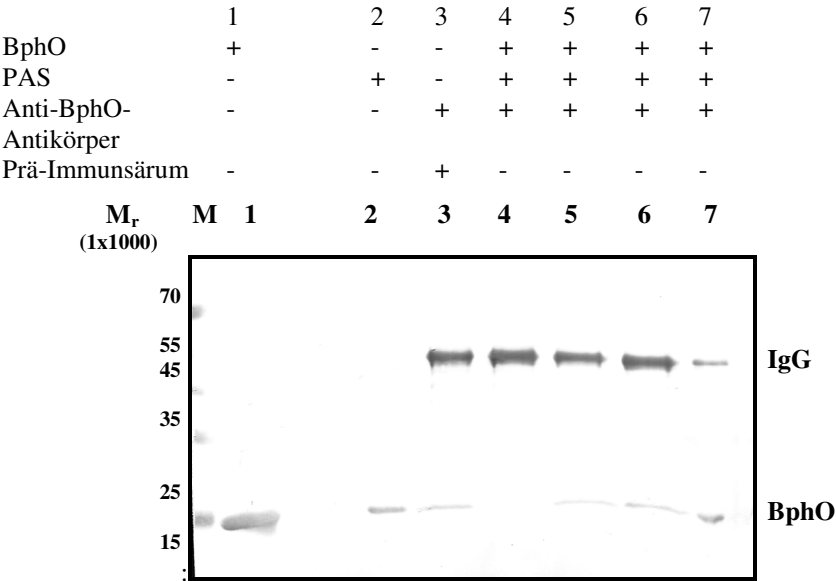
##### **4.4.7.1 *In vitro*-Immunopräzipitation**

Die polyklonalen Antikörper mussten zunächst auf ihre Spezifität untersucht werden. Hierzu wurden die Anti-BphO-Antikörper aus Kaninchen gegen die rekombinant gereinigten Proteine aus zwei unterschiedlichen Expressionssystemen titriert (Abbildung 43, A und B). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Anti-BphO-Antikörper spezifisch mit dem BphO Protein sowohl aus pGex-6P1-*bphO* als auch aus pET28b-*bphO* reagiert. Um auszuschließen, dass die Antikörper gegen Teile des GST-tags gerichtet sind, wurde ebenfalls eine Titration gegen gereinigte GST-BphO und GST-PebA (freundlicherweise von Thorben Dammeyer zur Verfügung gestellt) durchgeführt (Abbildung 43, C und D). Hierbei konnten keine unspezifischen Kreuzreaktionen mit GST beobachtet werden.



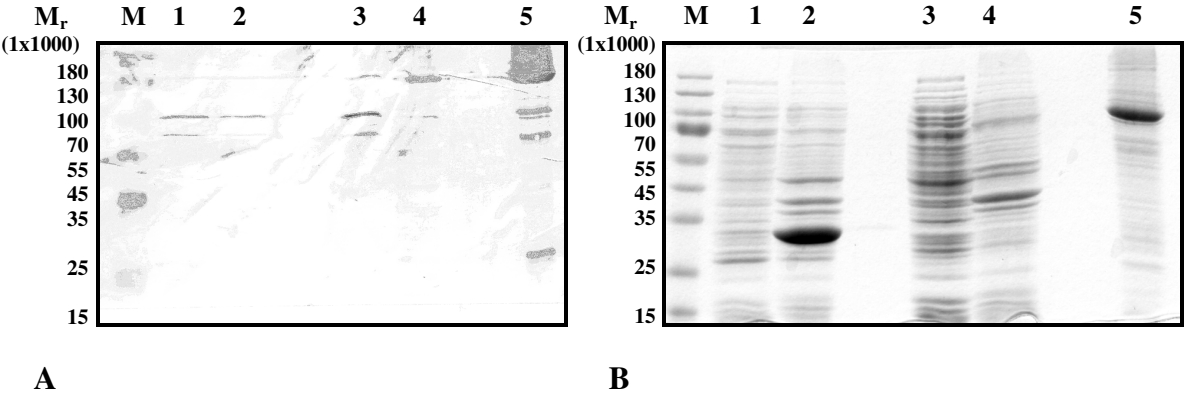
**Abbildung 43:** Western-Blot Analyse der Titration der produzierten Antikörper BphO aus Kaninchen gegen rekombinant hergestellte Proteine aus unterschiedlichen Expressionssystemen (**A**, **B**) und gegen GST-Proteine (**C**, **D**). Unter A und C sind PFDV-Membranen gezeigt und unter B und D die entsprechende SDS-PAGE-Analyse. Der Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ( $\times 10^3$ ) ist angegeben (Spur M). Spur A1/B1 zeigt GST-BphO, Spur A2/B2 pET28b-BphO, Spur C1/D1 GST-BphO und Spur C2/D2 BphO. In C3/D3 wurde GST-PebA und in C4/D4 PebA aufgetragen.

Nun wurde der Anti-BphO-Antikörper für *in vitro*-Immunopräzipitationsexperimente gegen das gereinigte BphO Protein in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen titriert und durch Bindung an PAS isoliert. Der Western Blot wurde mit Anti-BphO-Antikörper entwickelt (Abbildung 44). Auffallend ist, dass bei allen Ansätzen BphO immuno-präzipitiert werden konnte. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl PAS (Abbildung 44, Spur 2), was in Abwesenheit von Anti-BphO-Antikörper unspezifisch an das gereinigte BphO Protein bindet, als auch das Prä-Immunserum (Abbildung 44, Spur 3) eine unspezifische Bindung mit dem Anti-BphO-Antikörper eingeht. Diese Tatsache verhinderte den *in vitro*-Nachweis der Komplexbildung des Anti-BphO-Antikörpers mit dem Antigen.



**Abbildung 44:** Western-Blot Analyse der *in vitro*-Immunopräzipitation von gereinigtem BphO mit Anti-BphO-Antikörper. Der Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ( $\times 10^3$ ) ist angegeben (Spur M). Positivkontrolle mit gereinigtem BphO (Spur 1). Negativkontrolle mit PAS (Spur 2) und mit Prä-Immunsärum (Spur 3). Das gereinigte und über PAS immunopräzipitierte BphO: 0  $\mu$ M (Spur 4), 0,25  $\mu$ M (Spur 5) 0,5  $\mu$ M (Spur 6) und 1  $\mu$ M (Spur 7).

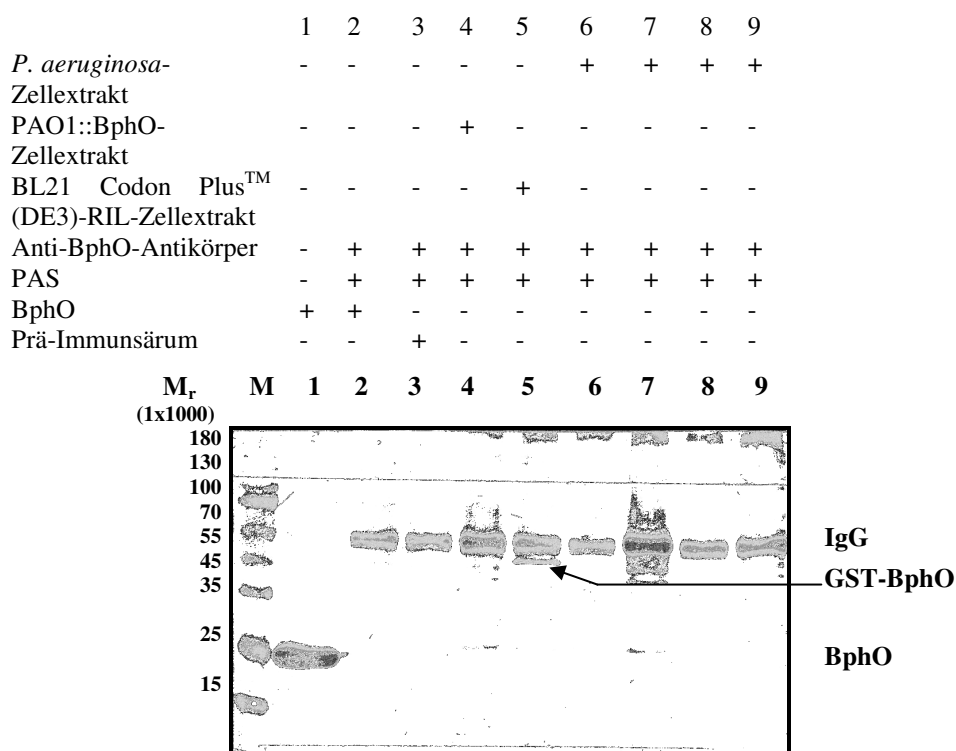
Die Untersuchung auf die Spezifität des polyklonalen Anti-BphP-Antikörper zeigt Abbildung 45. Hierzu wurde der Anti-BphP-Antikörper gegen zellfreien Extrakt einer *E. coli*-Expressionskultur mit pASK-*bphP* (freundlicherweise von Dr. Ronja Tasler zur Verfügung gestellt) und mit pASK-*fnr* (freundlicherweise von Dr. Heike Reents zur Verfügung gestellt) titriert. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass der Anti-BphP-Antikörper auch unspezifisch mit anderen Proteinen reagiert.



**Abbildung 45:** Western-Blot Analyse der Titration der produzierten Antikörper BphP aus Kaninchen gegen *E. coli*-Zellextrakte (A, B). Unter **A** ist eine PFDV-Membran gezeigt und unter **B** die entsprechende SDS-PAGE-Analyse. Der Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ( $\times 10^3$ ) ist angegeben (Spur M). Spur A1/B1 zeigt pASK-*bphP*, Spur C2/B2 BphP. In C3/D3 wurde pASK-*fnr* und in C4/D4 Fnr aufgetragen. Spur C5/D5 zeigt das gereinigte BphP als Positivkontrolle.

#### 4.4.7.2 *In vivo*-Immunopräzipitation

Da die Wechselwirkung des BphO mit BphP *in vitro* nicht gezeigt werden konnte, sollten *in vivo* Experimente durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden *P. aeruginosa*-Zellen aus der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase untersucht. Voraussetzung für das Gelingen einer Präzipitation sind die in physiologischen Puffern löslichen Antigene. Für die Lösung von den in physiologischen Puffern unlöslichen Antigenen (z.B. Proteine) können hochmolare Salze und/oder Detergenzien eingesetzt werden. Da bei dieser Art der Lösung von Antigenen jedoch Artefakte auftreten können, wurden entsprechende Kontrollen durchgeführt. Um die unbekannte Affinität des Anti-BphO-Antikörpers zu dem Antigen nicht zu beeinträchtigen, wurde auch die Wachstumszeit optimiert. Vor Beginn der Nachweisreaktion wurde ein Signalverstärker (Qentix<sup>TM</sup> Western Blot Signal Enhancer) eingesetzt, um die immunologische Nachweisreaktion zu verstärken. Die visuelle Nachweisreaktion wurde mittels Farb- und Chemilumineszenzreaktionen durchgeführt.

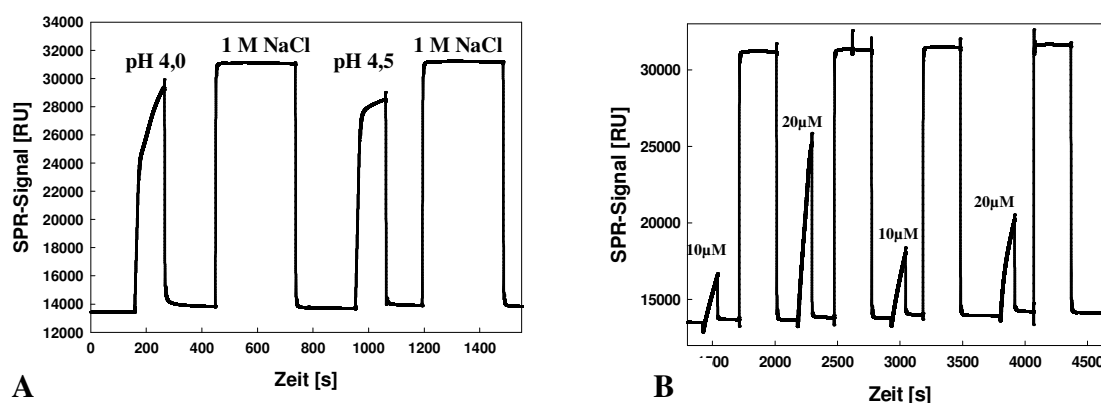


**Abbildung 46:** Western-Blot Analyse der *in vivo*-Immunopräzipitation von *P. aeruginosa* BphO mit einem *P. aeruginosa*-Zellextrakt. Der Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ( $\times 10^3$ ) ist angegeben (Spur M). Positivkontrolle mit gereinigtem BphO (Spur 1). Negativkontrolle mit rekombinantem BphO (Spur 2), mit Prä-Immunsärum (Spur 3) und mit PAO1::BphO (Spur 4). Mit Anti-BphO-Serum isolierter Immunkomplex aus dem *E. coli* BL21 Codon Plus<sup>TM</sup> (DE3)-RIL-Zellextrakt (Spur 5). Aus dem *P. aeruginosa*-Zellextrakt mit Anti-BphO-Serum isolierte Komplexe (24 h Spur 6; 8 h Spur 7; 4 h Spur 8; 2h Spur 9).

Wie aus Abbildung 46 hervorgeht, konnte nur das GST-BphO aus den *E. coli* BL21 Codon Plus<sup>TM</sup> (DE3)-RIL Zellen (Spur 5) als Immunkomplex detektiert werden und keine Immunkomplexe aus *P. aeruginosa*-Zellen. Alle Versuche, BphO aus *P. aeruginosa* durch Immunopräzipitation zu isolieren, führten nicht zum Erfolg. Somit konnte auch die Wechselwirkung zwischen BphO und BphP mittels Co-Immunopräzipitation nicht nachgewiesen werden.

#### 4.4.8 Untersuchung der BphO-BphP-Interaktion mittels SPR

Mittels SPR können (Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie) Protein-Protein-Wechselwirkungen bei sehr niedrigen Affinitäten analysiert und in Echtzeit verfolgt werden. Die benötigten Proteinmengen sind sehr gering. Diese Methode wurde gewählt, um die Interaktion von BphO und BphP zu charakterisieren.



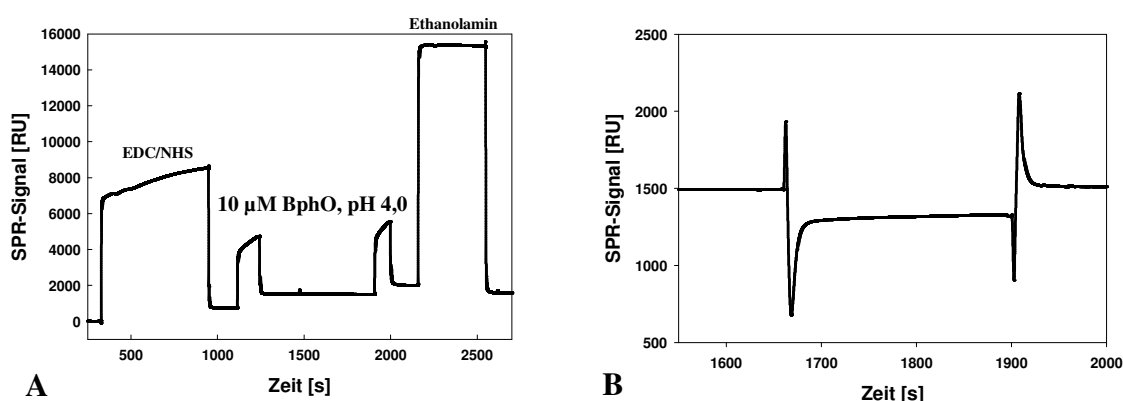
**Abbildung 47:** Vorversuche für die Kopplung von BphO. **A:** Dargestellt sind die Signalkurven bei verschiedenen pH-Werten. Dazu wurde BphO jeweils in Natriumacetat-Puffern mit pH-Werten von 4,0 und 4,5 verdünnt und auf die Chipoberfläche injiziert. Der Anstieg des Signals während der Injektion bei pH 4,0 zeigt die Anreicherung von BphO an der Chipoberfläche. **B:** Dargestellt sind Konzentrationen an BphO, die an der nicht aktivierten Chipoberfläche getestet wurden. Dazu wurde BphO in Natriumacetat-Puffer mit pH 4,0 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Chipoberfläche injiziert.

Vor der kovalenten Immobilisierung des BphO auf einen CM-5-Chip wurde bei unterschiedlichen Präkonzentrationen untersucht, welcher Kopplungspuffer den optimalen pH-Wert besitzt, d.h. unter welchen Bedingungen sich aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen besonders viel Ligand an der Chipoberfläche anreichert. Wie Abbildung 47, A zeigt, war vor allem bei pH 4,0 eine stark erhöhte Ligandenkonzentration an der Chipoberfläche messbar, während bei pH 4,5 eine schwache Anreicherung von BphO erkennbar war. Diese Beobachtung erklärt sich durch den berechneten pI von BphO, der bei 5,1 liegt. Bei kleineren pH-Werten besitzt das Protein eine negative Gesamtladung und wird von der positiv geladenen Dextranbeschichtung der Chipoberfläche



elektrostatisch angezogen. Für die Immobilisierung von BphO wurde 10  $\mu$ M Proteinlösung verwendet (Abbildung 47, B).

Abbildung 48, A zeigt das Sensorgramm der Immobilisierung von BphO. Die Injektion dieses Gemisches stellt sich am Sensorgramm als vorübergehende Verschiebung des Signalniveaus nach oben dar. Die dabei entstandenen N-Hydroxysuccinimidester reagieren mit Amino- und anderen nukleophilen Gruppen des anschließend injizierten Liganden, wodurch dieser kovalent an die Sensorchipoberfläche gebunden wurde. Dies wird im Sensorgramm dadurch illustriert, dass die Signalkurve nach der Injektion des BphO nicht wieder auf das vorherige Niveau zurückfällt. Anschließend wurden die nach der Kopplung noch vorhandenen reaktiven N-Hydroxysuccinimidester inaktiviert, wobei durch die hohe Ionenstärke der dazu verwendeten Ethanolaminlösung gleichzeitig eine Elution nicht kovalent gebundener Moleküle von der Sensoroberfläche erfolgte, die Differenz der Signalniveaus vor und nach der Aminkopplung ( $\Delta$ RU) gibt die Menge des immobilisierten Liganden wieder. In diesem Fall betrug sie 1.580 RU.



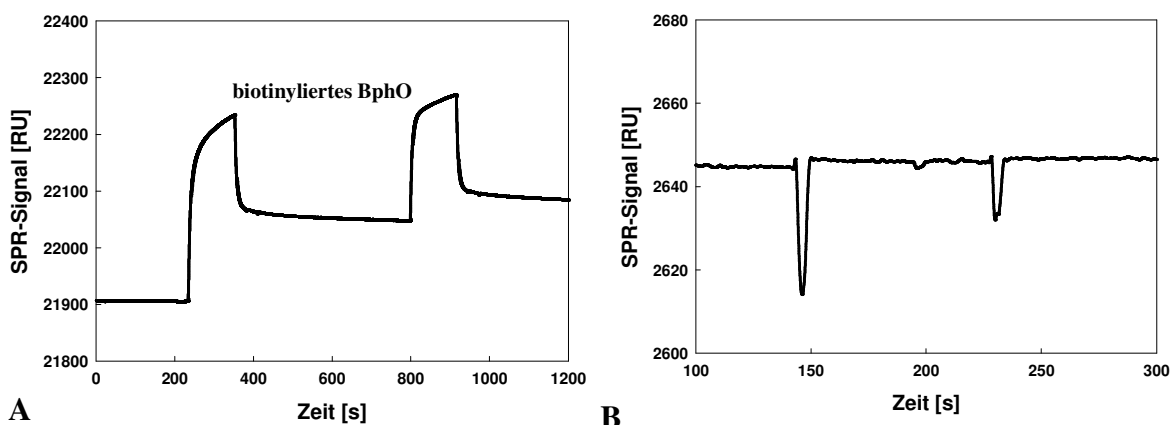
**Abbildung 48:** **A:** Immobilisierung von BphO durch eine kovalente Aminkopplung. Die Dextranmatrix der Chipoberfläche wurde mit EDC und NHS aktiviert, BphO bei pH 4,0 gebunden und freie reaktive N-Hydroxysuccinimidester mit Ethanolamin abgesättigt. Die Differenz der Signalniveaus vor und nach der Kopplung ( $\Delta$ RU) gibt die Menge an gebundenem BphO wieder. **B:** Sensorgramm der Bindung des BphP. 10  $\mu$ l 1 mM BphP-Lösung wurde injiziert und standardmäßig mit Laufpuffer gewaschen. Es erfolgte kein Anstieg der SPR-Signale ( $\Delta$ RU).

Für die Analyse der Wechselwirkung wurde das gereinigte BphO über eine Aminkopplung auf einen CM-5-Chip gekoppelt, während das BphP in BIAcore-Puffer injiziert wurde. Nach der Injektion von BphP über den CM-5-Chip erfolgte kein Anstieg der Resonanzeinheiten, eine Assoziation bzw. eine Dissoziation war nicht zu erkennen (Abbildung 48, B). Auch durch die Zugabe von Häm, Ascorbinsäure und  $H_2O_2$  zum Puffersystem wurde keine Bindungskurve gemessen. Eine spezifische Bindung zwischen BphO und BphP konnte demnach nicht bestätigt werden.

Dafür könnten folgende Gründe in Frage kommen. Die Aminkopplungsmethode von SPR

kann negative Folgen auf die physiologische Aktivität des gekoppelten Proteins haben. Zum einen, werden für die Immobilisierung auf CM-5-Chip primäre Aminosäure des Proteins bei sehr niedrigen pH-Werten (pH 4,0) protoniert, was eine negative Auswirkung auf die biologische Aktivität des BphO auf dem Chip haben könnte. Zum Anderen, können Proteine während der Immobilisierung einen Verlust ihrer Aktivität erleiden. Aus diesen Gründen wurde eine schonende alternative Kopplungsmethode über Streptavidin-Biotin getestet, bei der die Aktivität der Proteine nicht beeinträchtigt wird.

Das BphO wurde mit einem Sulfo-NHS-Biotin-Reagenz (Pierce) über primäre Aminogruppe sowohl am N-Terminus (pH 7,0) als auch am C-Terminus (pH 8,0) biotinyliert und anschließend auf einen mit Streptavidin versetzten Sensorchip (SA-Chip) gekoppelt (Abbildung 49, A). Die Differenz der Signalniveaus vor und nach der Streptavidin-Biotin-Kopplung ( $\Delta$ RU) gibt die Menge des immobilisierten Liganden von 313 RU wieder.



**Abbildung 49:** **A:** Immobilisierung von biotinyliertem BphO durch Streptavidin-Biotin-Kopplung. Das mit Sulfo-NHS-Biotin-Reagenz biotinylierte BphO wurde über N-terminale Aminogruppe auf die SA-Chipoberfläche gekoppelt. Die Differenz der Signalniveaus vor und nach der Kopplung ( $\Delta$ RU) gibt die Menge an gebundenem BphO wieder. **B:** Sensorgramm der Bindung des BphP. 10  $\mu$ l 1 mM BphP-Lösung wurde injiziert und standardmäßig mit Laufpuffer gewaschen. Es erfolgte kein Anstieg der SPR-Signale ( $\Delta$ RU).

Leider konnte auch durch diese Kopplungsmethode keine BphO-BphP-Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 49, B). Da diese Methode nach heutigem Kenntnisstand die höchste erreichbare Sensitivität bezüglich auch schwacher Interaktionen aufweist, kann daraus gefolgert werden, dass BphO und BphP keinen stabilen, nachweisbaren Komplex bilden. Die Interaktion zwischen BphO und BphP scheint also eher transient zu sein und der Freisetzung des BVs aus BphO zu dienen.

Andererseits können elektrostatische Interaktionen bei solchen transienten Komplexen schneller destabilisiert werden, als die Komplexe gebildet werden können (Voznesensky

und Schenkman, 1994). Die Bildung eines solchen transienten Komplexes zwischen humaner HO-1 und CRP, über den der Elektronentransfer erfolgt, konnte von Wang und Ortiz de Montellano 2003 gezeigt werden. Für die Untersuchungen wurde die FRET-Methode angewendet. Diese Methode könnte auch für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen BphO und BphP angesetzt werden. Eine weitere sinnvolle Maßnahme wäre, eine analytische Ultrazentrifugation anzuwenden. Die Besonderheit der analytischen Ultrazentrifugation ist, dass sie, im Gegensatz zu allen anderen Techniken, auch die Analyse kurzlebiger Komplexe erlaubt. Möglicherweise müssen andere Bedingungen für die BphO-BphP-Interaktion identifiziert werden, unter denen beide Proteine induziert (aktiv) werden. Wie bereits beschrieben, kann BphO den Chromophor für BphP liefern und die Aktivität von BphO könnte durch Interaktion zwischen BphO und BphP reguliert werden. Da die Funktion von BphP in der Steuerung von Prozessen liegt, die von Intensität und Dauer an Rotlichtstrahlung abhängig sind, sollten die physiologischen Bedingungen für die weiteren Untersuchungen der Interaktion von Bedeutung sein.

#### **4.5 Kristallisation**

Für die Röntgenstrukturanalyse ist die Produktion hochgeordneter Einkristalle von entscheidender Bedeutung. Ein kritischer Faktor für die Kristallisation ist die Gewährleistung der Homogenität der Proteinlösung. Vor der Kristallisation wurde die BphO-Lösung 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um eventuelle Schwebeteilchen oder Aggregate abzutrennen. Da die Kristallisationseigenschaften von Proteinen nicht vorhersagbar sind, wurde die Kristallisation von BphO unter einer Vielzahl von Bedingungen nach der Methode des sitzenden Tröpfchens bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Es wurde festgestellt, dass sowohl bei dem Pipettieren von Ansätzen als auch innerhalb einer Woche in ca. 95% der Ansätze Protein ausgefallen war. Aufgrund der Instabilität der *P. aeruginosa* BphO in Lösung wurde vermutet, dass die Neigung zu Aggregation des Proteins eine Kristallisation verhinderte (Kapitel 2.2.1).

## 5 Zusammenfassung

Hämoxygenasen (HO) katalysieren in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und geeigneten Elektronendonatoren die oxidative Spaltung von Häm zu Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid. HOs sind weitverbreitete Enzyme und kommen in Säugern, Pflanzen, Cyanobakterien und Bakterien vor. *Pseudomonas aeruginosa* ist das erste beschriebene Bakterium, das zwei Hämoxygenasen besitzt, die unterschiedliche Regiospezifitäten für die Hämspaltung besitzen. PigA wird nur unter eisenlimitierenden Bedingungen produziert und spaltet Häm an den ungewöhnlichen Positionen  $\beta$  und  $\delta$ , wobei die Biliverdine IX $\beta$  und IX $\delta$  entstehen. Dies ist bislang die erste HO mit einer solchen Regiospezifität. Sämtliche andere HOs besitzen Spezifität für die Spaltung der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke des Häms, so dass Biliverdin IX $\alpha$  entsteht. Zu dieser Gruppe gehört auch die zweite HO aus *P. aeruginosa*, BphO. Das Enzym wurde rekombinant in *E. coli* produziert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die Entstehung von Biliverdin IX $\alpha$  konnte mittels HPLC Analyse gezeigt werden. Zusätzlich bestätigten vergleichende  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Studien der beiden HOs die Positionierung des Häms innerhalb von BphO, die eine Hydroxylierung der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke zulässt. Als proximaler Häm-Ligand innerhalb von BphO wurde Histidin 20 mittels ortsgerichteter Mutagenese identifiziert. Diese BphO Variante konnte zwar noch Häm binden, dieses jedoch nicht mehr zu Biliverdin umsetzen.

Unterschiedliche Elektronendonatoren können *in vitro* die BphO Reaktion unterstützen. Verwendet man Ferredoxin als Elektronendonator so verläuft die Reaktion bis zum  $\text{Fe}^{3+}$ -Biliverdin. Durch Zugabe von Katalase konnte gezeigt werden, dass die Reaktion nur bis zum Oxyferro-Komplex abläuft, was die Vermutung nahe legt, dass bei Verwendung von Ferredoxin der letzte Schritt der Reaktion über entstandene Hydroperoxidradikale verläuft, also chemischer Natur ist. Nur durch Verwendung eines zweiten Reduktanden konnte der Oxyferro-Komplex zum Endprodukt umgewandelt werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass nur in Anwesenheit zweier Reduktanden Eisen-freies Biliverdin als Endprodukt beobachtet werden konnte. Dieses Endprodukt hat hohe Affinität zur Hämoxygenase, was schon während der Produktion und Reinigung durch eine grüne Farbe deutlich wurde. Aufgrund der Lokalisation von *bphO* in einem Operon zusammen mit *bphP*, einem Gen, dass für ein apo-Phytochrom kodiert, lag die Vermutung nahe, dass BphO den Chromophor für den potentiellen Photorezeptor BphP liefert. Es konnte

bestätigt werden, dass BphO den Chromophor für BphP liefert und BphP in der Lage ist, das festgebundene Biliverdin aus BphO herauszuziehen und so die BphO Reaktion zu beschleunigen. Durch Verwendung von Gelpermeationschromatographie, Immunopräzipitation und Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie konnten allerdings keine stabilen Komplexe zwischen BphO und BphP nachgewiesen werden, was auf eher transiente Natur der Interaktion zwischen beiden Proteinen hinweist.

## 6 Literatur

- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 215-237.
- Arora, A., Sairam, R.K., and Srivastawa, G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.*, **82**, 1227-1238.
- Avila, L., Huang, H-W., Damaso, C.O., Lu, S., Moenne-Loccoz, P., and Rivera, M. (2003) Coupled oxidation vs. heme oxygenation: insights from axial ligand mutants of mitochondrial cytochrome b<sub>5</sub>. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4103-4110.
- Beale, S.I., and Cornejo, J. (1984) Enzymatic heme oxygenase activity in soluble extracts of the unicellular red alga, *Cyanidium caldarium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 371-384.
- Beale, S.I., and Cornejo, J. (1991a) Biosynthesis of Phycobilins. Ferredoxin-Mediated Reduction of Biliverdin Catalyzed by Extracts of *Cyanidium caldarium*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22328-22332.
- Beale, S.I., and Cornejo, J. (1991b) Biosynthesis of Phycobilins. 3(Z)-Phycoerythrobilin and 3(Z)-Phycocyanobilin are Intermediates in the Formation of 3(E)-Phycocyanobilin from Biliverdin IX. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22333-22340.
- Beale, S.I., and Cornejo, J. (1991c) Biosynthesis of Phycobilins. 15,16-Dihydrobiliverdin IX is a Partially Reduced Intermediate in the Formation of Phycobilins from Biliverdin IX. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22341-22345.
- Beale, S.I. (1993) Biosynthesis of phycobilins. *Chem. Rev.*, **93**, 785-802.
- Berkelman, T.R., and Lagarias, J.C. (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **156**, 194-201.
- Berry, E.A., and Trumpower, B.L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal. Biochem.*, **161**, 1-15.
- Bhoo, S-H., Davis, S.J., Walker, J., Karniol, B., and Viestra, R.D. (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature*, **414**, 776-779.

- Bonnet, R., and McDonagh, A.F. (1973) The meso-reactivity of porphyrins and related compounds. Part VI. Oxidative cleavage of the haem system. The four isomeric biliverdins of the IX series. *J. Chem. Soc.*, **9**, 881-888.
- Caignan, G.A., Deshmukh, R., Wilks, A., Zeng, Y., Huang, H.W., Moenne-Loccoz, P., Bunce, R.A., Eastman, M.A. and Rivera, M. (2002) Oxidation of heme to  $\beta$ - and  $\delta$ -biliverdin by *Pseudomonas aeruginosa* heme oxygenase as a consequence of an unusual seating of the heme. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14879-14892.
- Chu, G.C., Katakura, K., Zhang, X., Yoshida, T., and Ikeda-Saito, M. (1999) Heme degradation as catalyzed by a recombinant bacterial heme oxygenase (HmuO) from *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21319-21325.
- Chu, G.C., Park, S.Y., Shiro, Y., Yoshida, T., and Ikeda-Saito, M. (1999) Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of a recombinant bacterial heme oxygenase (HmuO) from *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Struct. Biol.*, **126**, 171-174.
- Clarke, T.E., Tari, L.W. and Vogel, H.J. (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr. Top. Med. Chem.*, **1**, 7-30.
- Colas, C., and Ortiz de Montellano, P.R. (2003) Autocatalytic radical reactions in physiological prosthetic heme modification. *Chem. Rev.*, **103**, 2305-2332.
- Cornejo, J., and Beale, S.I. (1997) Phycobilin biosynthetic reactions in extracts of cyanobacteria. *Photosynth. Res.*, **51**, 223-230.
- Cornejo, J., Willows, R.D., and Beale, S.I. (1998) Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant J.*, **15**, 99-107.
- Davies, D.R., and Segal, D.M. (1971) Protein crystallization: Micro techniques involving vapour diffusion. *Methods Enzymol.*, **22**, 253.
- Davis, S.J., Kurepa, J., and Vierstra, R.D. (1999) The *Arabidopsis thaliana* *HY1* locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6541-6546.
- Davis, S.J., Bhoo, S.H., Durski, A.M., Walker, J.M. and Vierstra, R.D. (2001) The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant. Physiol.*, **126**, 656-669.

- Drazek, E.S., Hammack, C.A., and Schmitt, M.P. (2000) *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. *Mol. Microbiol.*, **36**, 68-84.
- Dunn, N.W., and Holloway, B.W. (1971) Pleiotropy of p-fluorophenylalanin-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet. Res.*, **18**, 185-197.
- Emborg, T.J., Walker, J.M., Noh, B., and Vierstra R.D. (2006) Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **140**, 856-868.
- Fagerstam, L.G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B., and Ronnberg, I. (1992) Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J. Chromatogr.*, **597**, 397-410.
- Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T., and Lagarias, J.C. (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell*, **13**, 965-978.
- Frankenberg-Dinkel, N. (2004) Bacterial heme oxygenases. *Antiox. Redox Signal.*, **6**, 825-834.
- Friedman, J., Lad, L., Li, H., Wilks, A., and Poulos, T.L. (2004) Structural basis for novel  $\delta$ -regioselective heme oxygenation in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **43**, 5239-5245.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Hirotsu, S., Chu, G.C., Unno, M., Lee, D-S., Yoshida, T., Park, S-Y., and Ikeda-Saito, M. (2004) The crystal structures of the ferric and ferrous forms of the heme complex of HmuO, a heme oxygenase of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 11937-11947.
- Karniol, B., and Vierstra, R.D. (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2807-2812.
- Kharitonov, V.G., Sharma, V.S., Pilz, R.B., Magde, D., and Koesling, D. (1995) Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2568-2571.



- Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A., and Lagarias, L.C. (2001) The *Arabidopsis hy2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell*, **13**, 425-436.
- Koorneef, M., Rolf, E., and Spruit, C.J.P. (1980) Genetic control of light-induced hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* L Heynh. *Z. Pflanzenphysiologie*, **100**, 147-160.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G., and Abian, J. (2004) The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry*, **43**, 3659-3669.
- Lee-Robichaud, P., Wright, J.N., and Akhtar, M. (1995) Modulation of the activity of human 17  $\alpha$ -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) by cytochrome b<sub>5</sub>: endocrinological and mechanistic implications. *Biochem. J.*, **308**, 901-908.
- Lemberg, R. (1956) The chemical mechanism of bile pigment formation. *Rev. Pure. Appl. Chem.*, **6**, 1-23.
- Liu, Y., and Ortiz de Montellano, P.R. (2000) Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5297-5307.
- Loeb, M.R. (1995) Ferrochelatase activity and protoporphyrin IX utilization in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.*, **177**, 3613-3615.
- Maines, M.D., Ibrahim, N.G., and Kappas, A. (1977) Solubilization and partial purification of heme oxygenase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **252**, 5900-5903.
- Maines, M.D. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.*, **2**, 2557-2568.
- Matsui, T., Nakajima, A., Fuji, H., Matera, K.M., Migita, C.T., Yoshida, T., and Ikeda-Saito, M. (2005) O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent verdoheme degradation by heme oxygenase: reaction mechanisms and potential physiological roles of the dual pathway degradation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 36833-36840.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **299**, 906-909.

- Migita, C.T., Zhang, X., and Yoshida, T. (2003) Expression and characterization of cyanobacterium heme oxygenase, a key enzyme in the phycobilin synthesis. Properties of the heme complex of recombinant active enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 687-698.
- Muramoto, T., Tsurui, N., Terry, M.J., Yokota, A., and Kohchi, T. (2002) Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant. Physiol.*, **130**, 1958-1966.
- Neuzil, J., and Stocker, R. (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.*, **331**, 281-284.
- O'Carra, P., and Colleran, E. (1969) Coupled oxidation of myoglobin with ascorbate as a model of haem breakdown *in vivo*. *FEBS Lett.*, **5**, 295-298.
- Ortiz de Montellano, P.R. (1998) Heme oxygenase mechanism: evidence for an electrophilic, ferric peroxide species. *Acc. Chem. Res.*, **31**, 543-549.
- Ortiz de Montellano, P.R. (2000) The mechanism of heme oxygenase. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 221-227.
- Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2001) Homologues of neisserial heme oxygenase in Gram-negative bacteria: degradation of heme by the produkt of the *pigA* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **183**, 6394-6403.
- Rhie, G., and Beale, S.I. (1992a) Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-supported NADPH-independent heme oxygenase and phycobilin-formig activities from *Cyanidium caldarium*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16088-16093.
- Rhie, G., and Beale, S.I. (1992b) Biosynthesis of phycobilins. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16088-16093.
- Rhie, G., and Beale, S.I. (1995) Phycobilin biosynthesis: reductant requirements and product identification for heme oxygenase from *Cyanidium caldarium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**, 182-194.
- Rice, J.K., Fearnley, I.M., Barker, P.D. (1999) Coupled oxidation of heme covalently attached to cytochrome b<sub>562</sub> yields a novel biliprotein. *Biochemistry*, **38**, 16847-16856.
- Rivera, M., and Walker, F.A. (1995) Biosynthetic preparation of isotopically labeled heme. *Anal. Biochem.*, **230**, 295-302.
- Rivera, M., and Caignan, G.A. (2004) Recent developments in the <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic analysis of paramagnetic hemes and heme proteins. *Anal. Bional. Chem.*, **378**, 1464-1483.

- Rivera, M., and Zeng, Y. (2005) Heme oxygenase, steering dioxygen activation toward heme hydroxylation. *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 337-354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sano, S., Sano, T., Morishima, I., Shiro, Y., and Maeda, Y. (1986) On the mechanism of the chemical and enzymic oxygenations of  $\alpha$ -oxyprotohemin IX to Fe, biliverdin IX $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 531-535.
- Schachter, B.A., Nelson, B.E., Marver, H.S., and Masters, B.S. (1972) Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3601-3607.
- Schmidt, H.H. (1992) NO, CO and OH. Endogenous soluble guanylate-cyclase-activating factors. *FEBS. Lett.*, **307**, 102-107.
- Schmitt, M.P. (1997) Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J. Bacteriol.*, **179**, 838-845.
- Schuller, D.J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P.R., and Poulos, T.L. (1999) Crystal structure of heme oxygenase-1. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 860-867.
- Schuller, D.J., Zhu, W., Stojiljkovic, I., Wilks, A., and Poulos, T.L. (2001) Crystal structure of heme oxygenase from the gram-negative pathogen *Neisseriae meningitidis* and a comparison with mammalian heme oxygenase-1. *Biochemistry*, **40**, 11552-11558.
- Sigman, J.A., Wang, X., Lu, Y. (2001) Coupled oxidation of heme by myoglobin is mediated by exogenous peroxide. *J. Am. Chem. So.*, **123**, 6945-6946.
- Silin, V., and Plant, A. (1997) Biotechnological applications of surface plasmon resonance. *Trends in Biotechnology*, **15**, 353-359.
- Skaar, E.P., Gaspar, A.H., and Schneewind, O. (2004) IsdG and IsdI, heme degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 436-443.
- Snyder, S.H., Jaffrey, S.R., and Zakhary, R. (1998) Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.*, **26**, 167-175.

- Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., and Dawson, J.H. (1996) Heme-containing Oxygenases. *Chem. Rev.*, **96**, 2841-2888.
- Sugishima, M., Omata, Y., Kakuta, Y., Sakamoto, H., Noguchi, M., and Fukuyama, K. (2000) Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with heme. *FEBS Lett.*, **471**, 61-66.
- Sugishima, M., Sakamoto, H., Noguchi, M., and Fukuyama, K. (2004) CO-trapping site in heme oxygenase revealed by photolysis of its CO-bound heme complex: mechanism of escaping from product inhibition. *J. Mol. Biochem.*, **341**, 7-13.
- Sugishima, M., Migita, C.T., Zhang, X., Yoshida, T., and Fukuyama, K. (2004) Crystal structure of heme oxygenase-1 from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in complex with heme. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 4517-4525.
- Sugishima, M., Hagiwara, Y., Zhang, X., Yoshida, T., Migita, C.T., and Fukuyama, K. (2005) Crystal structure of dimeric heme oxygenase-2 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in complex with heme. *Biochemistry*, **44**, 4257-4266.
- Sun, J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P.R., and Loehr, T.M. (1993) Resonance Raman and EPR spectroscopic studies on heme-heme oxygenase complexes. *Biochemistry*, **32**, 14151-14157.
- Suzuki, T., Sato, M., Ishikawa, K., and Yoshida, T. (1992) Nucleotide sequence of cDNA for porcine heme oxygenase and its expression in *Escherichia coli*. *Biochem. Int.*, **28**, 887-893.
- Tai, S.S., Wang, T.R., and Lee, C.J. (1997) Characterization of hemin binding activity of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **65**, 1083-1087.
- Takahashi, S., Wang, J., Rousseau, D.L., Ishikawa, K., Yoshida, T., Host, J.R., and Ikeda-Saito, M. (1994) Heme-heme oxygenase complex. Structure of the catalytic site and its implication for oxygen activation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1010-1014.
- Tasler, R., Moises, T., and Frankenberg-Dinkel, N. (2005) Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J.*, **272**, 1927-1936.
- Tasler, R. (2006) Biochemische Charakterisierung der Phytochrome aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Aspergillus nidulans*. Dissertation, Universität Braunschweig.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmidt, R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 748-755.

- Terry, M.J., McDowell, M.T., and Lagarias, J.C. (1995) (3Z)- and (3E)-Phytochromobilin are Intermediates in the Biosynthesis of the Phytochrome Chromophore. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11111-11118.
- Vasil, M.L., and Ochsner, U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.*, **34**, 399-413.
- Voznesensky, A.I., and Schenkman, J.B. (1994) Quantitative analyses of electrostatic interactions between NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 enzymes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15724-15731.
- Wagner, J.R., Brunzelle, J.S., Forest, K.T., and Vierstra, R.D. (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature*, **438**, 325-331.
- Wang, J., and Ortiz de Montellano, P.R. (2003) The binding sites on human heme oxygenase-1 for cytochrome P450 reductase and biliverdin reductase. *J. Biol. Chem.*, **278**, 20069-20076.
- Weber, P.C. (1997) Overview of protein crystallization methods: macromolecular crystallography. *Methods Enzymol.*, **276**, 13.
- Wilks, A., and Ortiz de Montellano, P.R. (1993) Rat liver heme oxygenase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22357-22362.
- Wilks, A., Sun, J., Loehr, T.M., and Ortiz de Montellano, P.R. (1995) Heme oxygenase His25Ala mutant: replacement of the proximal iron ligand by exogenous bases restores catalytic activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2925-2926.
- Wilks, A., and Schmitt, M.P. (1998) Expression and characterization of a heme oxygenase (HmuO) from *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 837-841.
- Wilks, A., and Moönn-Loccoz, P. (2000) Identification of the proximal ligand His-20 in the heme oxygenase (HmuO) from *Corynebacterium diphtheriae*. Oxidative cleavage of the heme macrocycle does not require the proximal histidine. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11686-11692.
- Wilks, A. Heme oxygenase: evolution, structure and mechanism. (2002) *Antioxid. Redox. Signal.*, **4**, 603-604.
- Willows, R.D., Mayer, S.M., Foulk, M.S., DeLong, A., Hanson, K., Chory, J., and Beale, S.I. (2000) Phytobilin biosynthesis: the *Synechocystis* sp. PCC 6803 heme oxygenase-

- encoding *ho1* gene complements a phytochrome-deficient *Arabidopsis thaliana hyl* mutant. *Plant. Mol. Biol.*, **43**, 113-120.
- Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1978) Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4224-4229.
- Yoshida, T., Noguchi, M., and Kikuchi, G. (1980) Oxygenated form of heme, heme oxygenase complex and requirement for second electron to initiate heme degradation from the oxygenated complex. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4487-4491.
- Zeng, Y., Deshmukh, R., Caignan, G.A., Bunce, R.A., Rivera, M., and Wiks, A. (2004) Mixed regioselectivity in the Arg-177 mutants of *Corynebacterium diphtheriae* heme oxygenase as a consequence of in-plane heme disorder. *Biochemistry*, **43**, 5222-5238.
- Zhang, X., Migita, C.T., Sato, M., Sasahara, M., and Yoshida, T. (2005) Protein expressed by the *ho2* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a true heme oxygenase: Properties of the heme and enzyme complex, *FEBS J.*, **272**, 1012-1022.
- Zhang, X., Sato, M., Sasahara, M., Migita, C.T., and Yoshida, T. (2004) Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1713-17242.
- Zhu, W., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2000) Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of *Neisseria* is a heme oxygenase. *J. Bacteriol.*, **182**, 6783-6790.

### **Danksagung**

Ich möchte mich vor allem bei Frau Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, hervorragende Betreuung dieser Arbeit, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft sowie für die Möglichkeit viele neue Erfahrungen in der wissenschaftlichen Arbeit zu gewinnen bedanken.

Bei Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich herzlich für die Begutachtung dieser Arbeit sowie für Diskussionen während der Mittwochsseminare bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. R. Mendel sowie für die freundliche Teilnahme an der Prüfungskommission.

Für das hervorragende Arbeitsklima, den bereitwilligen Hilfsstellungen im Labor, den nicht-wissenschaftlichen Unterhaltungen beim Kuchenessen möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kollegen der AG Frankenberg bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Thorben Dammeyer, Steffi Klein, Ronja Tasler und Nicole Frankenberg-Dinkel für die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit. Ich glaube, ich habe euch einige Male zum Aufstöhnen geführt.

Bei allen Mitgliedern der AG von Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre ganz herzlich bedanken!

Erkenntlich zeigen möchte ich mich auch bei Thomas Wollert aus der AG Heinz (GBF) für seine Hilfe bei der Durchführung von SPR-Experimenten.

Ganz besonders danke ich meiner Familie für die Unterstützung und das Verständnis während meiner Promotionszeit.